



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사 학위논문

가시광선 영역에서 3D 프린팅 가능한
실크 피브로인/젤라틴 복합 잉크의
제조 및 인쇄 특성 분석

**Silk fibroin/gelatin composite ink for
3D printing in visible light and its printability**

2019 년 8 월

서울대학교 대학원

바이오시스템·소재 학부

이 현 지

가시광선 영역에서 3D 프린팅 가능한
실크 피브로인/젤라틴 복합 잉크의
제조 및 인쇄 특성 분석

Silk fibroin/gelatin composite ink for
3D printing in visible light and its printability

지도교수 현 진 호

이 논문을 농학석사 학위논문으로 제출함
2019 년 6 월

서울대학교 대학원
바이오시스템·소재 학부
이 현 지

이현지의 석사 학위논문을 인준함
2019 년 8 월

위 원 장 김 태 일 (인)

부위원장 현 진 호 (인)

위 원 기 창 석 (인)

초 록

본 연구에서는 Digital Light Processing (DLP) 3D 프린팅을 위한 실크 피브로인 기반 잉크 재료에 대해 연구하였다. 세포 생존 능력에 대한 생체 적합성을 고려하여 실크 피브로인과 젤라틴을 재료로서 선택하였다. 천연 효소인 리보플라빈은 가시광선 범위의 조사에서 실크 피브로인 분자의 다이타이로신 결합을 통한 가교 반응을 개시하여 실크 피브로인 하이드로젤을 형성한다. 그러나, 실크 피브로인 하이드로젤은 베타-시트 구조의 빠른 형성 및 결정화로 인하여 37 °C의 인산 완충 식염수 용액에서 수축하는 현상을 보였다. 실크 피브로인 잉크에 젤라틴을 첨가함으로써 실크 피브로인 하이드로젤의 수축을 효과적으로 방지할 수 있었다. 실크 피브로인/젤라틴 복합 잉크에서 젤라틴의 비율이 증가함에 따라 제조된 3D 구조물의 베타-시트 구조의 밀도가 감소하고 하이드로젤의 구조적 변형이 감소하였다. 그러나, 젤라틴의 첨가는 실크 피브로인/젤라틴 복합 잉크의 혼탁도를 증가시키고 DLP 인쇄에서 빛 산란의 발달로 인한 인쇄 정확도를 감소시킨다. 인쇄된 하이드로젤의 물리적 특성과 상세한 인쇄 공정에 대해 논의했다.

주요어 : 3D DLP printing, silk fibroin, gelatin, riboflavin, hydrogel, dimensional stability, printing accuracy

학 번 : 2017-29451

목 차

초록	i
목차	ii
List of Tables	v
List of Figures	vi
제 1 장 서 론	1
제 2 장 문헌 연구	5
2.1 3D DLP 바이오-프린팅	5
2.1.1. 3D 바이오-프린팅의 개념 및 특징	5
2.1.2. 3D 바이오-프린팅의 종류	6
2.2. 실크 피브로인	7
2.2.1. 실크 피브로인의 특징	7
2.2.2. 실크 피브로인의 2차 구조	8
2.2.3. 실크 피브로인 결정화의 방지	9
2.3. 젤라틴	10
2.4 리보플라빈을 이용한 다이타이로신 결합 형성 ...	11
제 3 장 재료 및 방법	14
3.1. 재료 및 시약	14
3.1.1. 실크 피브로인 정련 및 용해	14
3.1.2. 젤라틴 및 리보플라빈 용해	14
3.2. 복합 잉크의 프린팅 및 하이드로젤의 특성	15
3.2.1. 3D DLP 프린팅 조건	15

3.2.2. 다이타이로신 결합의 형성 확인	18
3.2.3. 하이드로젤 탁도 변화를 통한 결정화 확인	18
3.3. 복합 하이드로젤의 변형 및 거동 분석	18
3.3.1. 감쇠 전반사 푸리에변환 적외분광 분석	18
3.3.2. 하이드로젤 팽윤 거동	19
3.4. 2차원 프린팅 정확도 평가	20
3.5. 복합 하이드로젤의 물리적 특성 분석	20
3.5.1. 역학적 특성 분석	20
3.5.2. 평형 함수율과 팽윤비 분석	21
3.5.3. 젤 분율 분석	21
3.5.4. 형태학적 분석	22
3.5.5. 세포 배양 및 Live/Dead 분석	22
 제 4 장 결과 및 고찰	 23
4.1. 복합 하이드로젤의 구조 분석	23
4.1.1. 다이타이로신 결합의 확인(fluorescence spectra) ·	23
4.1.2. 혼탁도 변화를 통한 결정화의 확인	25
4.2. 젤라틴 스페이서의 효과 분석	28
4.2.1. 결정화의 감소 및 구조의 축소 방지	31
4.2.1.1. 단백질 복합체의 2차 구조 분석(ATR-FTIR)	31
4.2.1.2. 무게와 부피의 변화 분석	35
4.2.2. 2차원 프린팅 정확도에 대한 영향 분석	39
4.3. 하이드로젤의 특성 분석	43
4.3.1. 압축 시험을 통한 기계적 물성 분석	43
4.3.2. 평형 함수율 / 팽창비 분석	46
4.3.3. 젤 분율 분석	46
4.3.4. 하이드로젤 단면 구조 특성	49
4.3.5. 세포 활성 분석	52

4.4. 바이오-잉크 최적 조건 고찰	54
제 5 장 결 론	55
참고문헌	57
Abstract	67

List of Tables

Table 1	Nomenclature of used ink composition. Column indicates the concentration of silk, and row indicates the percentage content of gelatin versus silk.	16
Table 2	Percentage of β -sheet peaks area relative to random coils.	34

List of Figures

- Figure 1** (A) A detailed mechanism by which riboflavin initiates crosslinking of tyrosine residues. (B) Reaction scheme of riboflavin in the silk fibroin chain. 13
- Figure 2** (A) Process of stacking silk fibroin based hydrogel with digital light processing(DLP). (B) Examples of fabricated multi-layer structure. 17
- Figure 3** Comparison of the degree of formation of dityrosine bond by fluorescence spectra. (A) Relative difference with silk fibroin concentration. Relative difference with gelatin concentration 0, 50, 100% to silk concentration (B) 2, (C) 4, (D) 6%. 24
- Figure 4** A comparison of the degree of formation of dityrosine bond fluorescence at 405 nm. 26
- Figure 5** (A) Silk fibroin hydrogel polymerized by riboflavin, which becomes opaque according to 72 h storage at 37 °C in PBS. (B) The turbidity change of the hydrogel observed at 37 °C for 12 h with UV-visible spectrometer. 27
- Figure 6** Schematics and examples showing the effect of adding gelatin as a spacer. (A) Decreasing β -sheet formation and their interaction. (B) Examples showing shrinkage of hydrogel. 29
- Figure 7** Schematics and examples showing the effect of

adding gelatin as a spacer. (A) pictures showing the addition of gelatin increases light scattering. (B) Schematic illustrating the resolution degradation that occurs during printing.	30
Figure 8 FRIR spectra according to silk concentration (A) 2%, (B) 4%, (C) 6% and gelatin content.	32
Figure 9 The difference in β -sheet content for various compositions of ink. (A) Calculated β -sheet content of hydrogel fabricated with S2G0, S4G0, S6G0. (B) Calculated β -sheet content according to gelatin concentration at 2, 4, 6%(w/v) silk fibroin concentration.	33
Figure 10 Graphs of volume change in 37 °C PBS of (A) 2 (B) 4 (C) 6%(w/v) silk fibroin concentration. Each value is expressed as a percentage of the mass for the initial state (0 h). (n = 4)	36
Figure 11 Graphs of mass change in 37 °C PBS of (A) 2 (B) 4 (C) 6%(w/v) silk fibroin concentration. Each value is expressed as a percentage of the mass for the initial state (0 h). (n = 4)	38
Figure 12 Pictures showing that the addition of gelatin increases the scattering of laser irradiated to ink.	40
Figure 13 (A) Pictures that showing the difference in hydrogel formed in different gelatin concentration when a line of varying thickness is applied. (B, C, D) Graphs comparing intentional line thickness and measured value of formed hydrogel thickness. (n = 4)	42

Figure 14	(A) Compressive modulus at 20% strain of initial state hydrogel. (B) Tangent modulus at 20% strain of the hydrogel after 72 h storage in 37 °C PBS and (C) its enlarged version. (n = 4)	44
Figure 15	Pictures showing the recovery property of the hydrogel prepared. (A) Hydrogel in initial state. (B) Hydrogel in which water extraction is prevented by gelatin spacer. (C) Hydrogel without added gelatin that lost recovery property due to formation of beta sheet.	45
Figure 16	(A) Equilibrium water content of hydrogels. (B) Equilibrium mass swelling ratio of hydrogels. (n = 4)	47
Figure 17	(A) Gel fraction of each hydrogels. (B) Dry mass of hydrogel prepared with 30 μ l precursor solution.	48
Figure 18	FE-SEM images of cross-sectional images of initial state of (A) S4G0, (B) S4G2 and β -sheet induced state of (C) S4G0, (D) S4G2. (scale bar : 100 μ m) ...	50
Figure 19	FE-SEM images of cross-sectional images of initial state of (A) S4G0, (B) S4G2 and β -sheet induced state of (C) S4G0, (D) S4G2. (scale bar : 4 μ m)	51
Figure 20	The survival rate of (A) Day 1, (B) Day 7 of each composition of hydrogel. (n = 3)	53

제 1 장 서 론

바이오-잉크를 사용한 3D 프린팅은 제작된 스캐폴드의 모양을 사용자가 정의할 수 있으며, 내부 네트워크 구조가 개방되어 있어 세포에 필요한 영양소의 공급을 향상시킬 수 있다는 점에서 기존의 스캐폴드 제작 방식에 비해 장점을 가진다[1]. 3D 바이오 프린팅을 위해서는 세포에 주는 독성을 최소화하는 프린팅 방법과 재료의 선택이 중요하며, 프린팅 과정에서뿐만 아니라 제작된 구조의 후처리 및 가공 과정에서도 그 형태 및 생적합성을 유지해야 한다.

현재까지 주로 쓰이는 3D 바이오 프린팅의 방식으로는 광 조형 기반(Stereo lithography-based), 압출 기반(Extrusion-based), 잉크젯(inkjet), 레이저 보조(Laser-assisted) 바이오-프린팅 방식이 있다[2-5]. 이 중에서 광 조형 방식은 프린팅 속도가 빠르며 200 μm 이하의 좋은 해상도를 가지며 제작된 구조물에서의 세포 활성이 좋다는 장점을 가진다[6, 7]. 하지만 광가교를 진행할 수 있는 재료를 선택해야 한다는 한계를 가지고 있으며, 광원으로서 UV를 사용할 경우 가시광선 광원을 사용할 때에 비해 세포에 독성이 심하다는 단점을 가지고 있다[8, 9]. 이에 따라 가시광선에 대한 광감응성을 가진 개시제의 사용이 필요하다. 현재 시판되고 있는 대부분의 광 조형 기반 3D 프린터는 가시광선을 조사하는 프로젝터를 사용한다는 점에서 또한 UV 광원의 사용이 지양된다.

본 연구에서는 디지털 광원처리 기반 광 조형(digital light processing(DLP)- based stereolithography) 방식과 생적합성이 높은 생체재료로서 널리 쓰이고 있는 실크 피브로인(silk fibroin) 및 젤라틴(gelatin)을 이용해 3D 바이오-프린팅을 진행하고자 한다. 또한, 가시광선 영역이 포함 된 330 ~ 470 nm에서 강한 흡광이 일어나 자유라디칼 반응을 통한 광중합을 개시할 수 있는 리보플라빈을

광개시제로 사용하였다.

3D 바이오-프린팅에 주로 사용되는 천연 재료로는 실크 피브로인, 젤라틴 메타크릴레이트, 알지네이트, 콜라겐, 히알루론산(hyaluronic acid) 등이 있으며 이 중 실크 피브로인은 세포의 활성이 좋으며 뛰어난 물성을 가지며 분해 속도의 제어가 쉽고 자연에서 매우 풍부하게 존재한다는 장점을 가진다[10-16]. 실크 피브로인은 약 5%의 타이로신(tyrosine, Tyr) 잔기를 가지며 단백질의 안정성, 탄성 및 강도에 기여할 수 있는 천연 다이타이로신 결합(dityrosine bond)을 형성할 수 있다는 연구가 보고되었다[17]. 선례 연구들에서는 단백질을 광가교 하기 위해 이중결합의 도입 등의 개질이 필요했다[18]. 본 연구에서는 리보플라빈을 사용하여 실크 피브로인에 대한 다른 개질 과정 없이 가시광선에 의해 효과적으로 광가교가 개시되는 것을 확인했다. 실크의 Tyr 잔기를 이용해 HRP와 같은 효소를 사용한 가교에 대한 연구도 진행된 바 있다[17]. 그러나 효소를 이용한 가교는 전구액 준비 과정이나 제조된 하이드로젤에서 효소의 침출을 막기 위해 혹독(harsh)한 조건이 필요하기 때문에 광가교로 이를 대체하고자 하였다. 현재까지 리보플라빈을 개시제로 하여 실크 피브로인을 가시광선을 통해 광개시하여 각막 재생에 이용하고자 한 연구[19]가 있으나, 약 50 μm 의 얇은 두께의 하이드로젤을 제작하였다. 현재까지 가시광선을 사용해 실크 피브로인을 적층하여 3차원 구조물을 형성한 연구는 진행되지 않았다.

한편, 실크 피브로인은 물리·화학적인 자극이 주어진다면 베타-시트(β -sheet)와 같은 2차 구조 형성이 일어나는 것으로 알려져 있으며 3차원 구조에서 결정화가 진행되는 경우 부피가 감소하는 현상이 관찰되었다[17, 20]. 이를 방지하기 위해 실크 피브로인 가닥 사이에 존재하며 공간을 넓혀주고 부피의 축소를 방지하는 스페이서(spacer)의 도입이 필요했다. 실크 피브로인의 결정화가 진행되면 구조의 신축성 감소 및 급격한 강성의 증가가 수반된다. 실크 피브로인 기반의 재료에 유연성을 부여하기 위해 다른 고분자를 실크 피브로인에 화학적으로

결합함으로써 결정화를 지연시키거나 감소시키려는 논문들이 보고되었다[21, 22]. 젤라틴은 생체 적합성이 높으며 세포 부착 서열을 가져 세포 고정 및 증식에 큰 이점을 가진다[23]. 또한, 아미노산 서열 중 약 1%의 Tyr 잔기를 포함하고 있어[24] 다이타이로신 결합을 통해 실크 피브로인과 화학적 결합을 형성함으로써 베타-시트의 형성으로 인한 3D 구조의 축소를 방지할 것으로 기대하였다.

3D 프린팅에 있어서 해상도 및 프린팅 정확도는 매우 중요한 요소이다. 의도한 구조물과 실제 프린팅된 구조물의 차이가 적어야 3D 프린팅 잉크로서 활용성이 높다고 평가할 수 있다. 3D 프린팅의 정확도를 높이기 위해서는 프린팅 과정에 있어서 한 층을 쌓을 때의 2차원 상의 정확도도 중요할 뿐만 아니라, 제조된 입체 구조물의 생체 적용 환경에서의 변형 또한 없거나 제어할 수 있어야 한다. 본 연구에서 젤라틴을 복합한 실크 피브로인/젤라틴 (S/G) 잉크의 프린팅 정확도를 평가하였다. 실크 피브로인에 복합되는 젤라틴의 비율에 따른 잉크의 조성을 설정하고 3D 구조물을 제작해 생체 조건(37°C, PBS)에서 보관하며 그 변형 거동을 관찰하였다. 또한, 한 층을 조성할 때의 2차원적인 프린팅 정확도를 평가하였다.

실크 피브로인을 이용해 3D 스캐폴드를 제작하기 위해서 잉크젯 방식을 이용하거나[10], UV를 사용하여 DLP 프린팅을 하거나[18], PDMS 틀을 이용해 3차원 구조체를 형성하거나[25], GelMA 등의 DLP 프린팅에서 보조적인 복합 재료로서 사용하는[23] 연구들이 진행되어왔다. 하지만 실크 피브로인을 가시광선을 이용해 직접 광가교하여 DLP 프린팅에 이용하는 연구는 매우 드물다. 실크 피브로인 기반 잉크를 사용한 3D 프린팅으로 제작된 구조체를 생체 조건에서의 변형까지 고려하여 의도한 형태와 프린팅된 형태의 차이를 최소화하는 연구 또한 진행되지 않았다. 이에 따라 본 연구에서는 가시광선을 사용한 DLP 프린팅을 통해 실크 피브로인 기반의 잉크를 직접 가교 및 적층하였다. 실크 피브로인과 젤라틴을 복합화 하여 제조된 3차원 구조물의 생체 조건에서의 형태적 안정성을 유지하였다. 다양한 실크

피브로인/젤라틴 조성을 가진 잉크를 사용하여 프린팅된 하이드로젤에 대하여 물성 평가를 통해 특징화하였다. 이를 통해 실크 피브로인을 주재료로 사용한 3D 바이오-잉크의 잠재적인 응용 가능성을 평가하였고, 잉크를 프린팅할 때의 해상도에 대한 평가 프로세스를 제시하고자 하였다.

제 2 장 문헌 연구

2.1. 3D DLP 바이오-프린팅

2.1.1. 3D 바이오-프린팅의 개념 및 특징

최근 물체의 디지털 설계 및 제작을 가능하게 하는 광반응 및 잉크 기반 인쇄 기술로서 적층 가공(additive manufacturing)을 사용한 3D 프린팅(three dimensional (3D) printing)기술에 대한 연구가 활발히 진행되어오고 있다. 주형(mold), 다이(dies) 또는 리소그래피 마스크를 필요로 하는 기존의 제조 방법과는 달리, 3D 프린팅은 디지털 조립을 사용하여 컴퓨터 보조(computer aided) 설계를 복잡한 3D 물체로 직접적이고 빠르게 제작할 수 있다[26]. 1986년 Charles W. Hull가 자외선으로 경화될 수 있는 얇은 층을 순차적으로 인쇄하여 3D 구조를 형성하는 ‘스테레오리소그래피(stereolithography)’방법을 고안하며 3D 프린팅의 역사가 시작되었다[27]. 이 방법은 이후 생물학적 물질로부터 3D 스캐폴드(scaffold)를 형성하기 위한 희생 수지 틀(sacrificial resin mold)을 만들기 위해 적용되었다. 현재는 환자를 위한 맞춤형 의료 기기, 약물 방출 캡슐과 같은 생체의료장치 분야 뿐만 아니라 인간 장기 모방과 같은 조직 공학 분야 및 재생 의학 분야 등에서 3D 프린팅에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[27 - 30].

잉크에 세포를 포함하여 인쇄하는 경우를 바이오-프린팅이라고 부른다. 3D 바이오-프린팅 기술은 환자의 요구 사항을 기반으로 필요할 때 소량 또는 단일 부품을 생산할 수 있다는 점 때문에 생체의료기기 및 조직 공학에서 상당한 이점을 가진다[31]. 또한, 바이오-프린팅 재료로서 대부분 생체 고분자를 활용하게 되는데 생체 적합성이 높을 뿐 아니라, 해상도가 높으며 이를 통한 프린팅 시 내부 네트워크 구조가 개방되어 있어 세포에 필요한 영양소의 공급을 향상시킬 수 있다는 점에서 장점을

가진다[1]. 또한, 맞춤형 마이크로미터 스케일의 스캐폴드를 제작함으로써 이전보다 훨씬 정확하게 세포 분포를 제어할 수 있다는 점에서 조직 공학 분야의 많은 어려움을 해결할 수 있다는 기대를 받는 기술이다[32].

2.1.2. 3D 바이오-프린팅의 종류

3D 바이오-프린팅은 크게 다음 네 가지 종류의 프린팅 방식을 사용한다. 잉크젯(inkjet) 프린팅, 압출-기반(extrusion-based) 프린팅, 레이저-보조(Laser-assisted) 프린팅 및 광조형-기반(Stereo lithography-based) 프린팅이다[1, 2]. 잉크젯 프린팅은 기존의 2D 인쇄와 매우 유사하지만, 잉크젯 바이오-프린팅이 갖는 가장 큰 차이점은 세포가 포함된 고분자 용액인 프리폴리머(prepolymer) 바이오-잉크를 사용한다는 점이다[33]. 그러나 잉크젯 방식은 잉크 방출구에서 연속된 흐름을 생성할 수 없다는 점에서 수직 3D 구조를 인쇄하는 데 어려움이 있음이 입증되었다[34]. 이러한 문제를 해결하기 위하여 펌프 또는 피스톤을 사용하여 높은 수직 실린더 형태로 바이오-잉크를 계속적으로 방출할 수 있는 압출-기반 프린팅이 고안되었다. 하지만 세포에 가해지는 전단 응력에 의해 세포 생존력을 떨어뜨린다(일반적으로 80% 이하의 생존율)는 연구 결과가 보고되었다[33]. 한편 레이저-보조 프린팅은 고강도의 레이저를 사용하여 세포 패터닝(cell patterning)을 위해 바이오-잉크를 적층하는 방식이다. 세포에 직접적으로 작용하는 힘이 없으므로 매우 높은 세포 활성을 유지할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 레이저 소스가 매우 비싸며 레이저 펄스의 제어가 복잡하다는 점에서 단점을 가진다[35]. 광조형-기반 프린팅은 빛을 통해 광감응성 고분자 재료의 중합을 일으키며 디지털 마이크로 어레이(digital micromirror arrays)를 사용하여 프린팅 영역을 픽셀 단위로 조절하는 방식이다. 광조형 기술은 다른 기술들에 비해 많은 장점을 가졌다. 광감응성 하이드로젤을 사용해 선 형태나 방울 형식이 아닌 층별로 인쇄를 할 수 있기 때문에,

한 층의 복잡성이나 크기에 관계 없이 한 층을 인쇄하는 데 걸리는 시간은 일정하며, 이에 따라 인쇄 시간을 크게 단축할 수 있다는 점이다[36]. 또한 노즐(nozzle)을 사용하지 않아 세포 생존율 또한 90% 이상으로 매우 높으며, 200 μm 이하의 좋은 해상도를 가진다[37]. 광조형 기반 프린팅은 고해상도로 빠른 속도 및 높은 세포 생존력을 가진 바이오-프린팅 분야에서의 경쟁력이 높은 기술인 것이다. 하지만 대부분의 광감응성 하이드로젤의 중합을 개시하는 개시제의 경우 자외선(UV) 광원을 사용해야 하며, 이때 UV가 세포 DNA의 손상을 일으키고 피부에 암을 유발할 수 있다는 점이 보고되었다[38]. 이에 따라 가시광선을 사용하여 광가교를 진행시킬 수 있는 젤라틴 메타크릴레이트(gelatin methacrylate, GelMA) [6, 39], 폴리에틸렌 글라이콜 다이아크릴레이트(poly(ethylene glycol) diacrylate, PEGDA)[40] 등을 바이오-잉크의 재료로 사용하여 세포에의 독성을 최소화하고자 하는 연구들이 진행되고 있다.

2.2. 실크 피브로인

2.2.1. 실크 피브로인의 특징

실크 피브로인(silk fibroin)은 실크의 주요 생산자인 누에(*Bombyx mori*, *B. mori*)의 실크 분비샘에서 생성되는 것으로, 누에의 다섯 번째 변태 끝에 고치(cocoon)형성 과정에서 실 형태로 분비되는 실크의 주요 구성성분이다. 실크는 두 개의 평행 피브로인 섬유와 그 표면에 결합된 세리신(sericin) 층으로 이루어져 있다[41]. 경사슬(light chain, ~26 kDa)과 중사슬(heavy chain, ~390 kDa)의 두 가지 단백질로 구성되어 있으며, 이 둘은 단일 이황화물 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다[42]. 실크를 알칼리 용액으로 끓여 세리신을 제거함으로써 얻어지는 실크 피브로인은 대부분이 글라이신(glycine, G),

알라닌(alanine, A), 세린(serine, S)으로 이루어져 있으며 주로 GAGAGS의 반복 아미노산 단위를 가지고 분자 내 또는 분자 간 수소결합을 통해 베타-시트(β -sheet) 결정 구조를 형성한다[43]. 실크 피브로인은 강도, 인성, 생체 적합성과 생분해성 및 열 안정성이 뛰어나 인공 합성섬유 및 다른 천연 섬유를 능가하는 특성을 가진다[44]. 또한, 실크 피브로인의 용액 상태에서부터 스폰지(sponge), 하이드로젤(hydrogel), 필름(film), 미세입자(micro particle), 미세 바늘(micro needle) 등의 다양한 형태로 재생하여 사용할 수 있어 활용성이 높게 평가되어왔다[45-50]. 이에 따라 수술용 봉합사[51], 약물 전달 시스템에서의 운반체[52]로 뿐만 아니라 각막[19], 신경[53] 및 뼈 조직 재생[54] 그리고 인공 피부 모사[55-57] 등의 스캐폴드로서 쓰임이 활발하게 연구되고 있다. 한편, 실크 피브로인에는 RGD 서열과 같은 세포 접착 모티프가 포함되어있다는 점 때문에 세포 배양 하이드로젤로서의 사용에 제한이 있는 것으로 평가되고 있다. 이에 따라 콜라겐, 젤라틴과 같은 생체 고분자와 복합하여 하이드로젤 스캐폴드의 재료로 사용하려는 등의 연구가 진행되고 있다[58].

2.2.2. 실크 피브로인의 2차 구조

실크 피브로인은 진동, 자기장, 온도 변화, 알코올 등의 물리·화학적 자극에 의해 알파 나선(α -helices), 베타 턴(β -turns), 불규칙 코일(random coil), 응집 가닥(agggregated strands), 베타-시트 등의 2차 구조를 형성한다[20]. 단백질의 주된 구성 성분은 글라이신, 알라닌 및 세린이며, 이 세 가지의 간단한 아미노산이 실크 피브로인의 결정질 영역(crystalline region)을, 부피가 크고 극성을 띠는 곁가지를 가진 다른 아미노산은 비정질 영역(amorphous region)을 형성한다[59]. 실크 피브로인의 다형체(polymorph)로는 무작위 코일 (random coil)로 이루어진 실크 I, 반 평행 베타-시트 구조(antiparallel β -sheet structure)로 구성된 실크 II, 공기/물 계면 조립(air/water assembled interfacial) 상태의 실크 III가 있다[45, 60]. 특히 실크 II의 베타-시트는

실크 피브로인을 생의학적으로 응용하였을 때 충분한 기계적 성능을 부여한다는 점에서 천연 고분자 기반의 하이드로젤의 열악한 기계적 성능에 의한 의학적 응용에서의 제약이자 단점을 극복할 수 있다는 평가를 받는다[61]. 이는 진동, 에탄올의 첨가, 전기장 등에 의해 물리적으로 형성이 유도될 수 있다[45, 62-64]. 하지만 베타-시트 형성을 기반으로 한 실크 피브로인 하이드로젤은 대부분 부적절한 기계적 성능을 보여 응용 분야에서 제한을 가진다[66]. 이에 따라 최근 신축성(elasticity)이 강한 재료를 제조하기 위해 생체 가교 시약인 HRP를 사용하여 화학적 결합을 진행시킨 새로운 실크 피브로인 기반 하이드로젤에 대한 연구[65]가 진행되었다. 하지만 시간에 따른 급격한 결정화의 진행에 의해 여전히 재료의 유연도(softness) 부분에서 열악한 기계적 성질의 결합이 생기는 것을 피하지 못했다. 또한, 결정화 과정에서 가교 결합 부위의 이종 응집체(heterogeneous aggregation)의 형성에 의해 하이드로젤에 열악한 광학 특성이 생겨 기계적 성능이 저하될 수 있다는 연구 결과 또한 보고되었다[66]. 실크 피브로인의 가교 및 환경 조건의 정도에 따라 시간에 따른 점진적인 결정화가 발생하며, 이에 의한 기계 역학에 급격한 변화가 일어날 수 있다는 연구 결과들이 보고되었다[65, 67-68]. 또한, 입체적인 구조물을 제작하였을 때 베타-시트 형성에 의한 구조의 축소가 일어나는 현상 또한 보고되었다[69, 17]. 이것을 다른 중합체나 펩타이드 및 단백질을 결합함으로써 실크 피브로인의 물리적인 젤화를 조절할 수 있으며, 이러한 한계를 해결할 수 있는 방법을 제공할 수 있을 것으로 기대되었다.

2.2.3. 실크 피브로인 결정화의 방지

최근 실크 피브로인의 결정화로 인한 신축성(elasticity)의 감소 및 강성(stiffness)의 급증을 완화하기 위해 실크 피브로인에 다른 고분자를 화학적으로 결합시키는 연구가 진행되고 있다[21, 70-71]. Nicole R. Raia, et al. 은 실크 피브로인과 히알루론산(hyaluronic acid)을

효소적으로 공유결합시켜 생체 적합성을 높이고 본래의 조직과 유사한 기계적 특성을 가지며, 실크 피브로인의 분해 속도가 조절 가능한 특성을 유지하는 복합 하이드로젤을 형성하였고 그 특성을 연구하였다[21]. 이 연구에서는 실크 피브로인에 화학적으로 결합된 히알루론산이 전체 구조의 수화 상태를 유지하고 고분자 사슬의 분리를 일으켜서 실크 피브로인의 자체 조립(self-assembly)을 억제하고, 베타-시트로의 변화를 지연시키거나 감소시킬 수 있다고 설명한다. 이들은 히알루론산의 농도가 높아질수록 순수한 실크 피브로인 하이드로젤에서 나타나는 기계적 성질, 결정성 및 수분 함량의 광범위한 변화를 더 효과적으로 방지한다는 결과를 얻어내었다. 또한, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)과 같은 다른 고분자량, 비분지형(unbranched) 친수성 고분자를 실크 피브로인에 가교 결합함으로써 유사한 결과를 얻을 수 있다고 주장하였다. 실크 피브로인과 폴리에틸렌 글라이콜 다이글라이시딜 이써(polyethylene glycol diglycidyl ether, PEG-DE)를 가교시켜 베타-시트 형성을 억제한 연구[70], 폴리 아크릴 아마이드(polyacrylamide, PAA)를 반-상호 침투(semi-interpenetrating, semi-IPN) 형태로 결합시켜 2차 구조 형성을 조절한 연구[71] 등이 있다. 한편, 젤라틴을 실크 피브로인의 물리적인 가교 및 캡슐화를 통해 복합화 하여 실크 피브로인 하이드로젤 구조의 유연성을 증가시키고자 한 연구 사례가 있다[72]. 이 연구에서는 젤라틴을 화학적으로 결합하거나 실크 피브로인의 2차 구조에 영향을 주지는 않았으나, 실크 피브로인 결정화의 감소를 유도해 전체적인 구조의 유연성을 얻어냈다는 결과를 보고하였다.

2.3. 젤라틴

젤라틴은 콜라겐을 가수분해하여 얻어지는 생체 고분자이다. 약 30℃에서 졸-젤 전이(sol-gel transition)를 일으키기며 30℃ 이하로

냉각(cooling) 시, 젤라틴의 무작위 코일에서 트리플-헬릭스(triple-helix) 형태로의 변형이 열적으로 유도되어 형태가 안정화 되도록 한다[73]. 반면 고온(체온 근처, 37℃)에서는 액체와 비슷한 성질을 가지며 매우 약한 기계적 성질을 나타내므로, 생의학 분야에서 사용되기 위해서는 체온에서 용해를 피하기 위한 화학적인 가교가 필수적이다[74]. 또한, 젤라틴은 다양한 종류의 결사슬로 이루어져 있어 가교 가능한 작용기(group)를 도입할 수 있는 다양한 화학적 변형 방법이 존재한다[75]. 가장 대표적으로 젤라틴을 무수 메타크릴산(methacrylic anhydride)으로 개질하여 화학적인 가교가 가능한 이중결합기를 가진 젤라틴 메타크릴레이트(gelatin-methacrylate, GelMA)로 치환하여 에오신 Y(eosin Y)와 같은 개시제를 이용해 광가교를 진행하는 경우가 있다[23]. 하지만 젤라틴을 화학적으로 개질하지 않고도 가교를 진행하였거나, 다른 고분자와 공유결합을 통해 연결한 경우들이 있다. HRP(horse radish peroxidase) 또는 티로시나아제(tyrosinase)와 같은 효소를 사용하여 젤라틴 사슬 내의 Tyr 잔기를 사용해 결합을 형성시키는 경우이다. 실크 피브로인-젤라틴 혼합물에 티로시나아제를 사용하여 고분자들의 Tyr 잔기들을 산화 및 축합 반응시켜 가교를 이루도록 하는 바이오-잉크를 개발한 사례가 있다[76]. 젤라틴을 단독으로 사용하였을 때 가장 단점이 되는 부분은 기계적 강도가 매우 낮다는 점이다[74]. 이에 따라 키토산, PEG, 실크 피브로인 등 다른 고분자에 복합하여 사용하는 물질로서 꾸준히 연구가 진행되고 있다[77, 78, 79]. 이처럼 젤라틴을 다른 고분자와 함께 복합하여 사용하였을 때 얻을 수 있는 이점은 젤라틴의 주사슬에 RGD 서열과 같은 천연 세포 결합 모티프를 가져 세포의 부착 및 증식을 증폭시킬 수 있다는 점이다[80]. 이처럼 젤라틴은 단독으로, 또는 다른 고분자와 함께 복합화하여 사용되며 생체 재료로서 매우 활발하게 이용되어오고 있는 재료이다.

2.4. 리보플라빈을 이용한 다이타이로신 결합 형성

리보플라빈은 생체 조직에서 자연적으로 존재하는 수용성 물질이며, 330 ~ 470 nm 사이의 빛을 강하게 흡수하여 광가교를 개시할 수 있는 물질이다[81]. 세포에 유해한 자외선보다 가시광선에 노출되어 분자를 가교할 수 있다는 점에서 생체의학 분야에서 매력적인 광개시제이다. 비교적 비특이적으로 반응을 일으킬 수 있어 콜라겐(collagen), 알지네이트(alginate), 키토산(chitosan)과 히알루론산(hyaluronic acid), PEG 등의 가교를 진행한 연구가 있다[19, 82-85]. 특히 콜라겐에서 사용된 논문의 경우 콜라겐 사슬 내의 Tyr 잔기를 이용하여 다이타이로신 결합(dityrosine bond)을 형성함으로써 반응을 진행시켰다. Applegate, Matthew B., et al.이 위와 같은 리보플라빈 개시에 의한 실크 피브로인을 사용한 각막 보충용 하이드로젤을 개발하며 다이타이로신 결합의 형성 기작을 연구한 바가 있다[19]. Kato et al.[86]에 따르면 광 여기(photoexcited) 된 리보플라빈이 콜라겐의 Tyr 잔기로부터 전자를 제거하며 Tyr 라디칼을 형성한다. 전자가 제거된 2개의 Tyr 라디칼이 이어서 단일 다이타이로신 복합체(Tyr-Tyr)로 화학적으로 가교를 형성한다. 이와 같은 반응을 **Figure 1**로 도식화하였다. 먼저 리보플라빈이 UV 또는 가시광에 의해 여기되어 반응성이 높으며 강력한 산화제로서 작용하는 삼중항(triplet) 리보플라빈이 된다(Figure 1A(1)). 삼중 항 여기 된 리보플라빈이 낮은 산소압에서 직접 기질과 반응하여 Tyr 라디칼을 형성하도록 하는 반응이 Type I 반응이다(Figure 1A(2)). Type II 반응에서는 산소가 충분한 상황에서 진행되는 반응으로, 여기된 리보플라빈이 삼중항 산소(triplet oxygen)에 작용하여 단백질과 상호 작용하는 반응성 산소 종인 단일항 산소(singlet oxygen)를 형성(Figure 1A(3))하고 Tyr 잔기에 라디칼을 형성하여(Figure 1A(4)) 가교를 진행하도록 한다[87]. 리보플라빈이 Tyr 잔기의 결합을 개시하여 가교를 형성하는 것을 Figure 1B로 나타내었다.

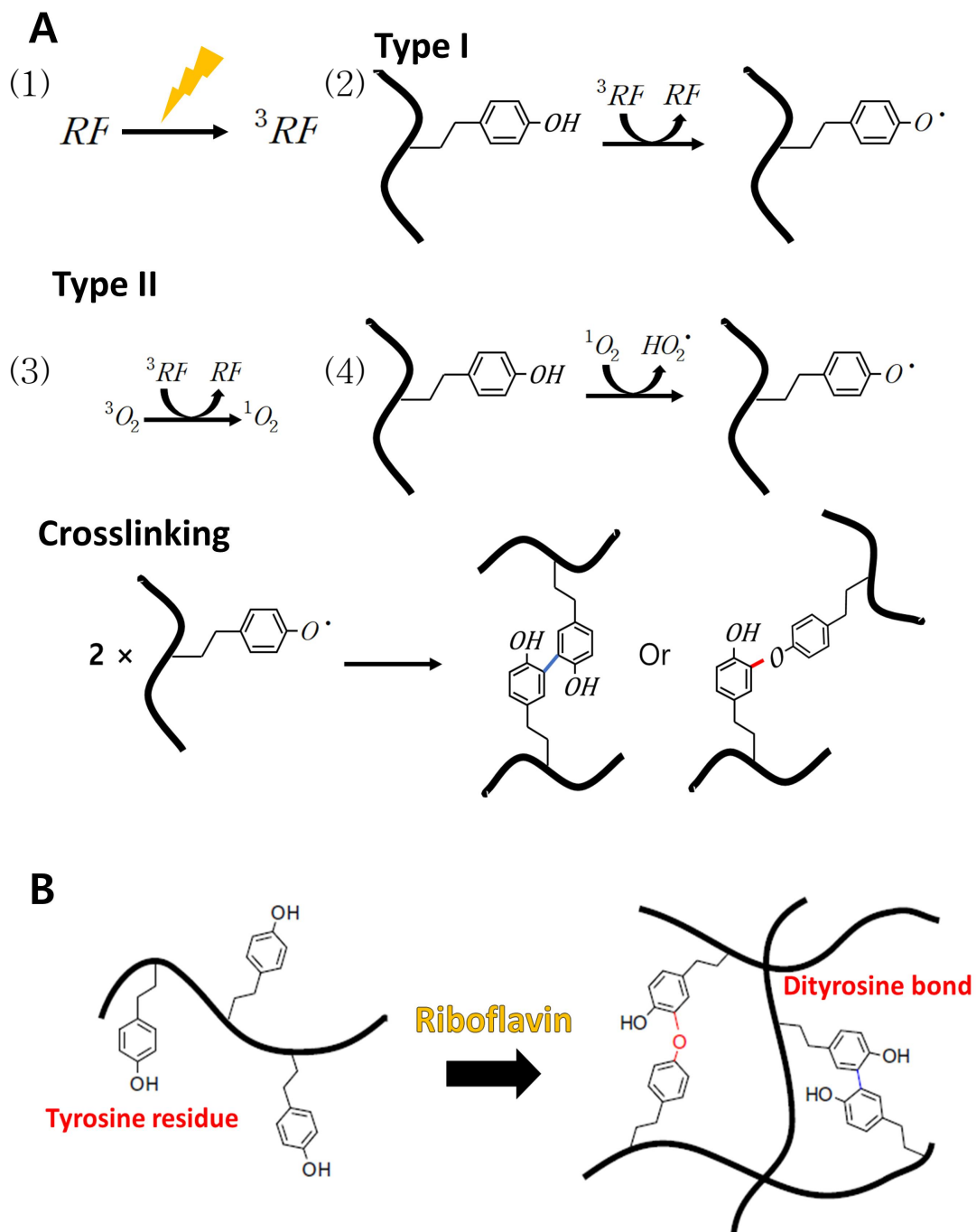


Figure 1. (A) A detailed mechanism by which riboflavin initiates crosslinking of tyrosine residues. (B) Reaction scheme of riboflavin in the silk fibroin chain.

제 3 장 재료 및 방법

3.1. 재료 및 시약

3.1.1. 실크 피브로인 정련 및 용해

실크 피브로인(silk fibroin)을 정련하기 위해 먼저 건조시킨 누에 고치(*Bombyx mori*) 40 g 을 3 g 나트륨 올레이트(sodium oleate)와 2 g 탄산 나트륨(sodium carbonate)의 1 L 수용액에서 60 분 동안 끓여 세리신(sericin)을 제거한다. 이를 건조 후 추출된 실크 피브로인을 60℃ 9.3 M 브롬화 리튬(lithium bromide, LiBr)에서 60 분 동안 용해시켰다. 용액을 셀룰로오스 아세테이트 멤브레인(MWCO 12 - 14 kDa)으로 3일 동안 투석하여 염을 제거한다. 이를 건조법을 사용해 농도를 측정하였을 때 6 ~ 6.7%(w/w)의 실크 피브로인 용액이 얻어짐을 확인하였다.

3.1.2. 젤라틴 및 리보플라빈 용해

젤라틴(porcine skin, type A, Sigma - Aldrich, Seoul, Korea)을 10%(w/v)으로 용해하여 초음파기(Ultra sonicator, SONICS Vibra cell, 130 W, 20 kHz, USA)를 이용해 초음파처리(진폭: 70%, 10 분)하여 트리플 헬릭스(triple-helix)를 단일 가닥으로 분리해 주었다. 이를 동결건조 하여 스펀지 형태의 초음파 처리된 젤라틴을 얻어내었다. 리보플라빈(riboflavin 5' -phosphate sodium salt hydrate, Sigma-Aldrich)은 100 mM 축적 용액으로 녹여 4 ℃에 보관하였으며, 추후 진행되는 모든 실험에서 최종 농도가 1 mM이 되도록 희석하여 사용하였다.

3.2. 복합 잉크의 프린팅 및 하이드로젤의 특성

3.2.1. 3D DLP 프린팅 조건

LabVIEW (National Instruments, USA) 소프트웨어를 이용해 stage controller를 작동시켰다. stage controller의 작동 범위는 0 ~ 70000 μm (작동 최소단위: 1 μm)였으며, 실험 과정에서는 0 ~ 15000 μm 범위로 한정하여 작동하였다. 프린팅 시 사용한 프로젝터(DLP Projector, Vivitek, DS23DAA, China)는 25 cm 거리에 백색광을 쬔어주었을 때 300 ~ 800 nm 범위의 파장에서 약 180,000 Lux의 조도를 보였다. 본 연구에서 사용한 DLP 프린팅 방식과 기존 대부분의 연구에서 사용한 DLP와 다른 점은 프로젝터 광원이 프린팅 스테이지의 윗부분에 존재해 아래층부터 쌓아 올리는 방식(bottom-up)을 사용하였다는 점이다. 이는 리보플라빈의 반응에 필요한 산소의 공급을 용이하게 하기 위해서이다. 모든 실험에서 한 층당 200 μm 로 150 초씩 쬔어 주어 입체 구조를 제작하였다. 예를 들어, 5 mm X 5 mm X 5 mm 의 정육각형 형태의 하이드로젤 샘플을 제작하기 위해서는 5 mm X 5 mm 정사각형 모양의 빛을 조사하며 LabVIEW 소프트웨어를 이용하여 200 μm 두께의 하이드로젤을 25번 적층하였다. 각 층의 빛 조사 시간은 150 초로 통일하였다. 모든 제작 과정에서 가열판을 이용해 잉크의 온도를 37°C로 유지하였다.

이후의 모든 실험에서 젤라틴의 영향을 확인하기 위한 샘플로서 실크 피브로인(S)의 농도 2, 4, 6%(v/w)에 대해 젤라틴(G)은 각 실크 피브로인 농도에 대해 0, 50, 100%의 농도가 되도록 한 9가지 종류 잉크를 설정하였다. 각각에 대한 명명을 **Table 1**으로 나타내었다. 리보플라빈의 농도는 1 mM로 고정하였다. 프린팅 과정과 다층 구조 프린팅 예시를 **Figure 2A**와 **Figure 2B**에 나타내었다.

Table 1. Nomenclature of used ink composition. Column indicates the concentration of silk, and row indicates the percentage content of gelatin versus silk.

Silk fibroin Gelatin	2 %(w/v)	4 %(w/v)	6 %(w/v)
0 %	S2G0	S4G0	S6G0
50 %	S2G1	S4G2	S6G3
100 %	S2G2	S4G4	S6G6

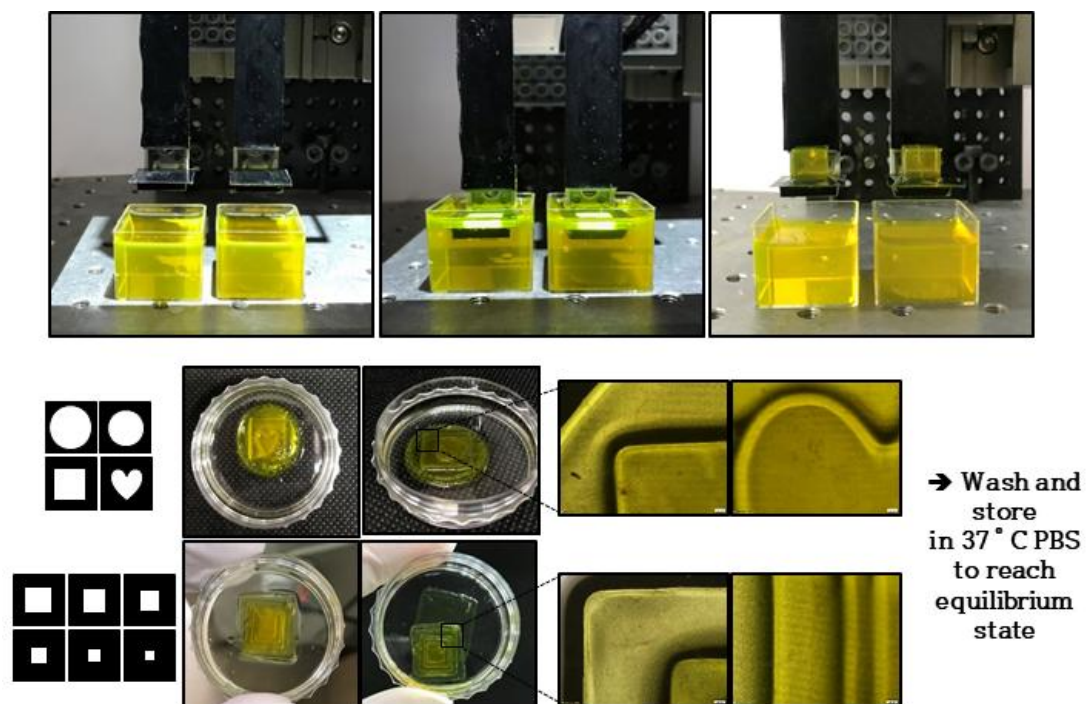


Figure 2. (A) Process of stacking silk fibroin based hydrogel with digital light processing(DLP). (B) Examples of fabricated multi-layer structures.

3.2.2. 다이타이로신 결합의 형성 확인

S/G의 조성에 따른 다이타이로신 결합의 형성 정도를 비교하기 위해 형광분석법(fluorescence spectra)을 이용하였다. 9 가지 S/G조성의 샘플들을 96 well plate에 각각 30 μ l씩 넣은 후 바닥에 고르게 퍼지도록 하였다. 프로젝터를 통해 광가교를 진행시키는데, 이 때 well plate 벽의 그림자가 영향을 줄 수 있으므로 well plate의 아래 방향에서 빛을 쬔어주었다. 반응을 끝낸 후 리보플라빈을 제거하기 위해 각 well에 PBS를 200 μ l씩 넣어주고 호일로 감싼 후 12시간 마다 PBS를 갈아주며 48시간 동안 행구었다. 이를 마이크로플레이트 리더(Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, Winooski, VT)를 통해 형광을 측정하였다.

3.2.3. 하이드로젤 탁도 변화를 통한 결정화 확인

S4G0 잉크를 통해 2.5 cm X 1 cm X 0.5 cm로 제작된 하이드로젤을 큐벳에 채워 넣고 UV-Vis 장비(UV/VIS Spectrophotometer, Optizen 2120UV, Korea)를 사용해 일정 시간 마다 흡광도를 측정하였다. 이 때, 씨쿨레이터를 통해 37°C로 유지하며 10 분 마다 흡광도를 측정하였다.

3.3. 복합 하이드로젤의 변형 거동 분석

3.3.1. 감쇠 전반사 푸리에변환 적외분광 분석

감쇠 전반사 푸리에변환 적외분광 분석(attenuated total reflection fourier transform infrared, ATR-FTIR, FTIR Nicolet 6700 with ATR accessory, Thermo Scientific, U.S.A.)을 이용해 제작된 다양한 S/G 조성의 하이드로젤에 대하여 만든 직후(0 시간)와 37°C의 PBS에 72 시간 보관한 후의 베타-시트 성을 분석하였다. 동결건조 시킨 S/G 하이드로젤에 대하여 1600 ~ 1700 cm^{-1} 범위의 아마이드 I 흡수

스펙트럼을 얻어냈으며 각 측정에 대해 4 의 분해능으로 128 회의 스캔을 수행하였다. 얻어진 아마이드 I 스펙트럼은 Origin 소프트웨어를 사용하여 1600과 1700 cm^{-1} 사이의 직선으로 기준선 보정을 수행한 다음 픽 분리(peak deconvolution)을 통해 실크 피브로인이 갖는 이차 구조들의 함량을 세분화하였다. 베타-시트의 함량(Content of β -sheet,%)을 다음의 식 (3)을 통해 계산하였다.

$$\text{Content of } \beta \text{-sheet (\%)} = \frac{\text{area of } \beta\text{-sheet peak}}{\text{total peak area}} \times 100 \quad (3)$$

3.3.2. 하이드로젤 팽윤 거동

젤라틴의 함량에 따른 S/G 하이드로젤의 팽윤 거동을 알아보기 위하여 각 S/G 조성에 대하여 5 mm X 5 mm X 5 mm 의 정육각형 형태의 하이드로젤 샘플을 제작하였다. 만들어진 직후 PBS에 담가 미반응 용액을 제거한 후 미세 저울을 이용해 초기 질량을 측정하고 버니어 캘리퍼스를 이용해 가로-세로-높이를 측정해 부피를 계산하였다. 37℃의 PBS에 96 시간 보관하며 24 시간 마다 반복하여 질량과 부피의 변화를 조사하였다. t 시간 후의 질량(M_t)과 부피(V_t)의 변화를 각각 식 (1), (2)에 따라 초기 상태(M_0 , V_0) 대비 질량/부피 비율(mass/volume change to initial state, %)로 계산하였고 변화 추이를 그래프로 나타내었다.

$$\text{Mass change to initial state (\%)} = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Volume change to initial state (\%)} = \frac{V_t}{V_0} \times 100 \quad (2)$$

3.4. 2차원 프린팅 정확도 평가

젤라틴의 첨가에 따른 잉크의 탁도 증가를 확인하기 위해 먼저 각 S/G 조성의 잉크에 레이저 빛을 통과시켜 투과도를 가시적으로 확인하였다. 다음으로 각 S/G 조성의 잉크에 선 형태의 빛을 조사하여 주변부의 가교 형성을 확인하였다. 3.5 π petri dish에 500 μ l 떨어뜨린 후 흔들어 평평하게 하였다. 가열판을 통해 잉크의 온도를 37°C로 유지하면서 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 μ m 두께의 선 형태로 빛을 조사하였다. 5분 동안 빛을 조사한 뒤 반응하지 않은 잉크를 증류수로 씻어낸 후 PBS로 행구었다. 붉은 잉크를 부어주어 하이드로젤이 형성된 부위를 염색하였다. 이에 따라 빛 조사 부위에 형성된 붉은 하이드로젤을 광학현미경을 통해 촬영한 후, ImageJ를 사용하여 실제로 프린팅된 두께를 측정한다. 의도한 두께와 실제 형성된 두께의 차이를 통해 나타내어 정확도를 평가하였다.

3.5. 복합 하이드로젤의 물리적 특성 분석

3.5.1. 역학적 특성 분석

만능 재료 시험기(Universal Testing Machine, Lloyd, Chichester, UK)를 사용하여 제조된 하이드로젤의 압축 강도 시험을 수행하였다. 압축 강도 시험은 10 N 로드셀을 사용하여 측정되었고, 각 실크 S/G 조성에 대하여 밑면 지름 8 mm와 높이 5 mm의 원통형으로 제작된 샘플에 대하여 40% 변형까지 압축하며 응력 - 변형 곡선을 얻어내었다. 20% 변형 시 접선 계수를 기준으로 하여 각 조성에 대한 압축 탄성률을 비교하였으며 만든 직후(0 시간)의 압축 탄성률과 37°C의 PBS에 72 시간 보관 후의 압축 탄성률의 두 경우로 나누어 분석 및 비교하였다. 이 때, 37°C에 보관한 샘플의 경우 베타-시트의 형성에 의해 구조가

축소되어 크기의 변화가 일어났다. 버니어 캘리퍼스를 통해 변형된 원통형 샘플의 밑면 지름과 높이를 측정 한 후 측정 조건에 반영하였다.

3.5.2. 평형 함수율과 팽윤비 분석

각 S/G 조성에 대하여 5 mm X 5 mm X 5 mm 의 정육각형 형태의 하이드로젤 샘플을 제작하였다. 이들을 37℃의 PBS에 72 시간 침지하여 평형 팽윤 상태에 이르게 한 후 습윤 질량(Me)을 측정하였다. 이 때, 주기적으로 PBS를 갈아주어 리보플라빈과 미반응 물질을 제거해주었다. 이후 다시 증류수에서 24시간 침지하여 PBS의 염을 완전히 제거하였으며, 완전 건조(60 ℃, 진공에서 72 시간)시킨 후 건조 질량(Md)을 측정하였다. 평형 함수율(equilibrium water content, EWC)과 팽윤비(swelling ratio, SR)를 각각 식 (4), (5)를 통해 계산하였다.

$$\text{EWC (\%)} = \frac{Me - Md}{Me} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{SR} = \frac{Me - Md}{Md} \quad (5)$$

3.5.3. 젤 분율 분석

9 가지 S/G조성의 잉크를 Metax(kanto kasei, Japan)를 통해 표면이 소수성을 띠도록 처리한 96 well plate에 각각 30 µl씩 넣었다. 잉크가 바닥에 고르게 퍼지도록 한 후 프로젝터를 통해 5 분 동안 광가교를 진행 시켰다. 미반응 고분자와 리보플라빈을 제거하기 위해 증류수를 200 µl 넣어 준 후 12 시간 마다 갈아주었으며, 호일을 감아 빛을 차단하며 실온에서 48 시간 교반하였다. 그 후 진공 건조기에서 완전 건조 후 건조 질량을 측정하였다. 젤 분율은 하이드로젤이 형성될 때 가교에 참여하는 고분자의 이론적인 건조 질량(Mc)을 계산하여 하이드로젤의 실제 측정된 건조 질량(Md)과 함께 다음과 같은 식 (6)으로 계산하였다.

$$\text{Gel fraction (\%)} = \frac{M_d}{M_c} \times 100 \quad (6)$$

3.5.4. 형태학적 분석

전계 방출형 전자현미경 (Field emission scanning electron microscope, FE-SEM, SIGMA, UK)을 이용하여 제작된 하이드로젤에 대한 단면의 구조를 확인하였다. S4G0, S4G2 잉크로 제작된 5 mm X 5 mm X 5 mm의 정육각형 형태의 하이드로젤을 동결건조한 샘플에 대하여 만든 직후(0 시간)와 37℃의 PBS에 72 시간 보관 후의 젤라틴의 첨가에 따른 FE-SEM 이미지를 얻어 단면 구조의 차이를 비교하였다.

3.5.5. 세포 배양 및 Live/Dead 분석

S/G 잉크를 쥐 섬유아세포(mouse fibroblast cell line, NIH-3T3)를 포함한 바이오-잉크로서 사용해 제작된 하이드로젤 내에서의 세포 활성을 관찰하기 위하여 Live/Dead 분석(Bio Vision)을 수행하였다. 세포를 담지한 각 조성의 잉크를 3.5 π petri dish에 200 μl 떨어뜨린 후 프로젝터를 이용해 150 초 동안 빛을 쬐어주는 과정을 두 번 반복해 2층의 하이드로젤 구조를 제작하였다. 미반응 잉크를 PBS로 빠르게 행구어 준 후 10%(v/v) FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) 2 ml를 부어주어 37 ℃, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. 1, 7일 동안 세포를 배양한 하이드로젤을 AM(calcein-AM)과 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)를 혼합한 Live/Dead 용액에 담그고 상온에서 1 시간 동안 교반하여 염색하였다. 형광현미경(Digital Microscope, CELENATMS, Korea)을 통해 형광 관찰을 수행하였다.

제 4 장 결과 및 고찰

4.1. 복합 하이드로젤의 구조 분석

4.1.1. 다이타이로신 결합의 확인(fluorescence spectra)

형광 분광법을 통해 젤라틴이 존재하지 않을 때의 실크 피브로인의 증가에 따른 다이타이로신 결합의 정도, 실크 피브로인의 농도를 고정하였을 때 젤라틴의 첨가 비율에 따른 다이타이로신 결합의 정도를 비교하였다. 다이타이로신 결합은 310 nm 파장의 빛으로 여기시켰을 때 400 ~ 410 nm 파장에서 강한 형광을 보인다. 이 때, 리보플라빈이 하이드로젤 내부와 주변에 남아 있는 경우 350 nm에서 450 nm 사이에서 넓은 흡광을 일으키면서 다이타이로신 결합의 형광 방출 신호를 상쇄시키기 때문에 리보플라빈의 수세 과정이 필수적이다. Matthew B. Applegate et al. [19]에 의하면 본래의 측정 방법은 리보플라빈을 증류수에 48 시간 보관하여 완전히 제거해야 한다. 하지만 본 실험에서는 완전히 수세 된 하이드로젤에 대한 400 nm 주변부의 형광 값이 기기의 신호 처리 가능한 구간을 초과해 정확한 데이터를 얻을 수 없었다. 이러한 기계적 스펙에 맞추어 procedure를 임의로 변경하여 모든 well의 시료에 리보플라빈 용액을 동일 농도, 동일 양으로 첨가하여 신호를 동일하게 줄여주었다. 따라서 얻어진 결과를 통해서는 절대적인 리보플라빈 양을 비교할 수 없으며, 상대적인 순서만 알 수 있을 뿐이다.

Figure 3A에서 실크 피브로인의 농도가 증가함에 따라 다이타이로신 결합을 대표하는 400 ~ 410 nm 봉우리가 높아지는 것을 확인했다. 실크 피브로인의 농도를 고정하고 젤라틴의 비율을 높여주었을 때에도 400 ~ 410nm 봉우리의 높이가 증가하는 것을 확인했다(**Figure 3B, C, D**). 모든 스펙트럼에서 각각 405 nm에서 최대 형광 값을 가졌다.

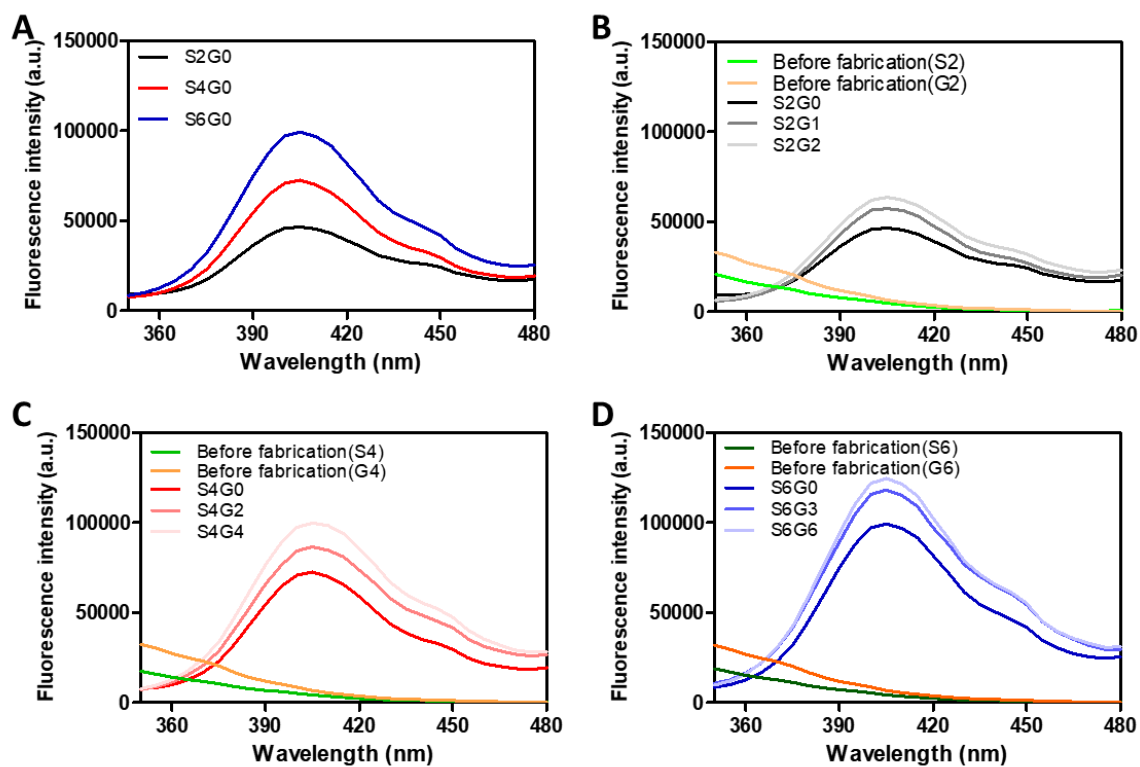


Figure 3. Comparison of the degree of formation of dityrosine bond by fluorescence spectra. (A) Relative difference with silk fibroin concentration. Relative difference according to gelatin concentration 0, 50, 100% to silk concentration (B) 2, (C) 4, (D) 6%.

Figure 4에서는 각각의 샘플에 대하여 405 nm에서의 형광값을 정리해 상대적인 다이타이로신 결합의 형성 정도를 비교해 보았다. 피브로인과 젤라틴의 함량이 높아짐에 따라 다이타이로신의 결합 형광이 증가하는 것을 확인했다. 또한, 고분자의 농도의 함이 같은 데이터들을 비교해 보았을 때, S4G0, S6G0의 최대 형광값이 각각 S2G2, S4G2의 최대 형광값보다 높게 나타난 것으로 보아 실크 피브로인의 타이로신 잔기의 결합이 젤라틴의 타이로신 잔기보다 결합 형성 기여도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 젤라틴 또한 리보플라빈에 의한 광가교 결합에 참여하지만 실크 피브로인에 비해 낮은 가교도를 가질 것이라는 결과를 도출할 수 있었다. 이는 선례 연구 결과에서 고분자를 이루는 아미노산 잔기의 전체 함량 중 실크 피브로인의 타이로신 잔기의 함량이 약 5%이며[17], 젤라틴의 타이로신 잔기의 함량이 1% 라는 점[24]을 고려하였을 때 고분자 가닥에서 다이타이로신 결합 반응에 참여하는 부분의 비율이 적기 때문이다.

4.1.2. 혼탁도 변화를 통한 결정화의 확인

제작된 실크 피브로인 하이드로젤의 37 °C의 PBS(pH 7.4)에 보관하며 혼탁도(turbidity)의 변화를 살펴본 결과, 약 40 분이 지난 후부터 혼탁도가 급격히 증가하기 시작했다(**Figure 5B**). 실크 피브로인 기반의 구조체에서 결정화가 진행되면 불투명도가 증가하게 된다[88]. S4G0 잉크로 제작한 하이드로젤의 37°C에서의 변화를 관찰하며 **Figure 5A**에서 이를 직접 확인할 수 있었다. 이는 네트워크 구조 내에서 높은 온도와 같은 물리적인 자극으로 형성된 베타-시트가 소수성 상호작용을 통해 베타-시트 구조의 밀접한 패킹(packing)으로 인한 결정화가 산발적으로 일어나기 때문이다. 이러한 물리적 가교는 투명도의 변화와 함께 기계적 물성의 급격한 증가와 소수성 증가 등의 효과를 수반한다. 또한, 12 시간 후에도 원만한 곡선을 그리며 흡광도가 증가함으로 보아 지속적으로 결정화가 진행됨을 확인하였다. 실크 피브로인을 화학적으로 가교해 하이드로젤을 제작한 후에 시간이 흐름에 따라 베타-시트

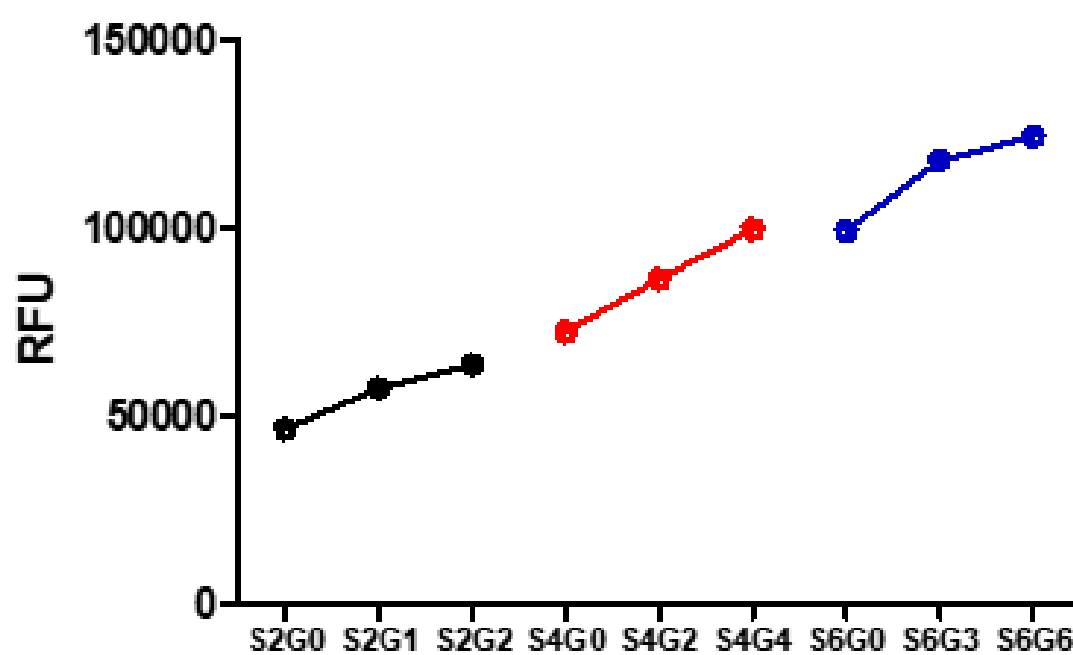
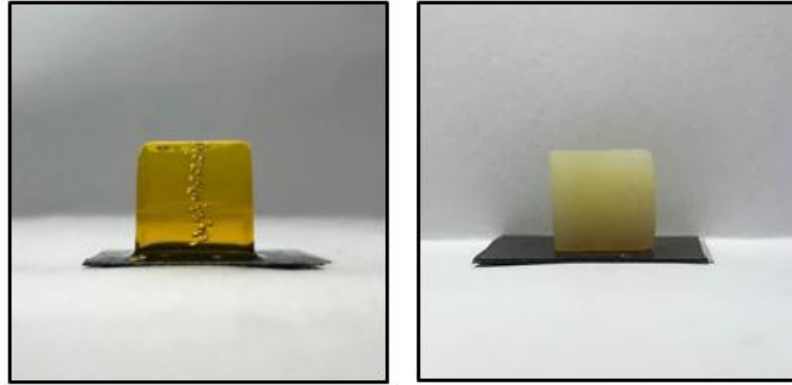


Figure 4. A comparison of the degree of formation of dityrosine bond fluorescence at 405 nm.

A Storage at 37 °C PBS for 72h



Transparent → Opaque

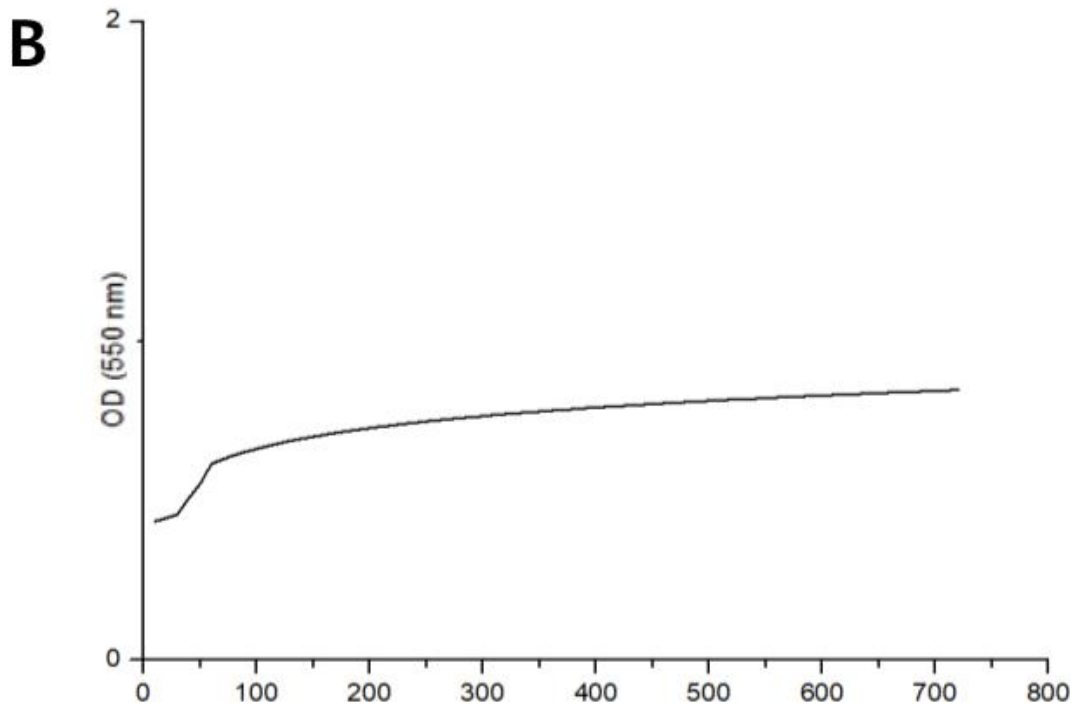


Figure 5 (A) Silk fibroin hydrogel polymerized by riboflavin, which becomes opaque according to 72 h storage at 37 °C in PBS. (B) The turbidity change of the hydrogel observed at 37 °C for 12 h with UV-visible spectrometer.

형성에 의한 구조의 축소 현상이 이전에도 보고되었다[17, 63] 이와 같은 현상은 하이드로젤 구조물이 의도한 크기와 모양으로 제작되지 않아 프린팅 정확도를 떨어뜨리게 되는 문제를 일으킨다. 본 연구에서 이를 해결하기 위하여 젤라틴을 스페이서로서 첨가하도록 하였다.

4.2. 젤라틴 스페이서의 효과

실크 피브로인의 베타-시트 형성에 따른 하이드로젤 구조의 축소에 관한 연구와, 그에 따라 다른 고분자를 화학적으로 결합하여 사용하여 베타-시트 형성을 지연시키거나 감소시키고 패킹을 방지하여 결정화도를 낮추는 연구가 진행되어 왔다[21, 70, 71, 72]. 젤라틴은 약 1%의 Tyr 잔기를 가지고 있다. 이에 따라 본 연구의 평가 조건에서 실크 피브로인과 함께 다이타이로신 결합을 형성하며 실크 피브로인과 복합화되어 베타-시트 형성 및 결정화를 억제할 것으로 기대된다. 또한, 친수성 성질을 띠는 젤라틴이 비교적 소수성을 띠는 실크 피브로인 사슬 사이사이에 끼어 들어가 구조체의 전체적인 친수성을 높여주는 역할을 하고 결과적으로는 하이드로젤에 팽윤 상태에 대한 안정성을 부여할 것으로 기대하였다. 젤라틴을 복합하지 않은 하이드로젤의 경우 37℃의 PBS에서 베타-시트 형성을 추진력으로 하여 구조의 축소가 일어남과 함께 소수성이 증가하고 물의 방출이 일어난다. 반면 젤라틴을 복합할 경우 베타-시트의 패킹을 억제하고 구조체 내의 친수성 부분을 증가시킴으로써 물을 함유하려는 경향을 증가시키며 축소를 방지한다. 이를 **Figure 6**을 통해 도식화하였다. 하지만 젤라틴의 첨가 시 잉크의 혼탁도가 증가하는 경향을 보였으며 이에 따라 프린팅을 위해 빛을 조사하였을 때 빛의 산란이 일어나 2차원 상의 프린팅 정확도를 저하시키는 것을 관찰하였다(**Figure 7**). 본 연구에서는 이것을 용액 상태에서 젤라틴의 첨가에 따른 실크 피브로인의 부분적인 입자화에 기인한 것으로 추측하였다. 젤라틴을 스페이서로서 첨가했을 때 S/G

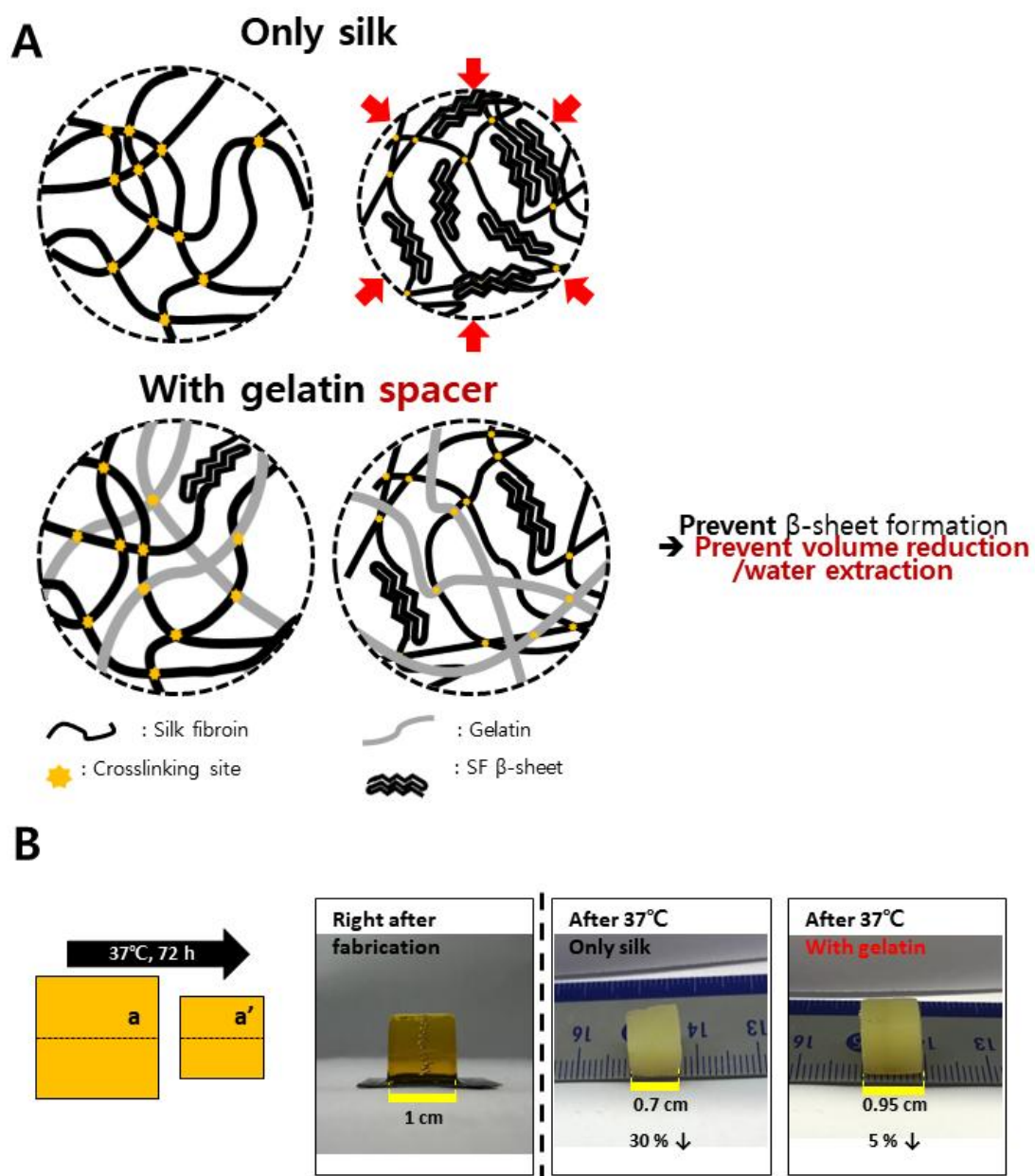


Figure 6 Schematics and examples showing the effect of adding gelatin as a spacer. (A) Decreasing β -sheet formation and their interaction. (B) Examples showing shrinkage of hydrogel.

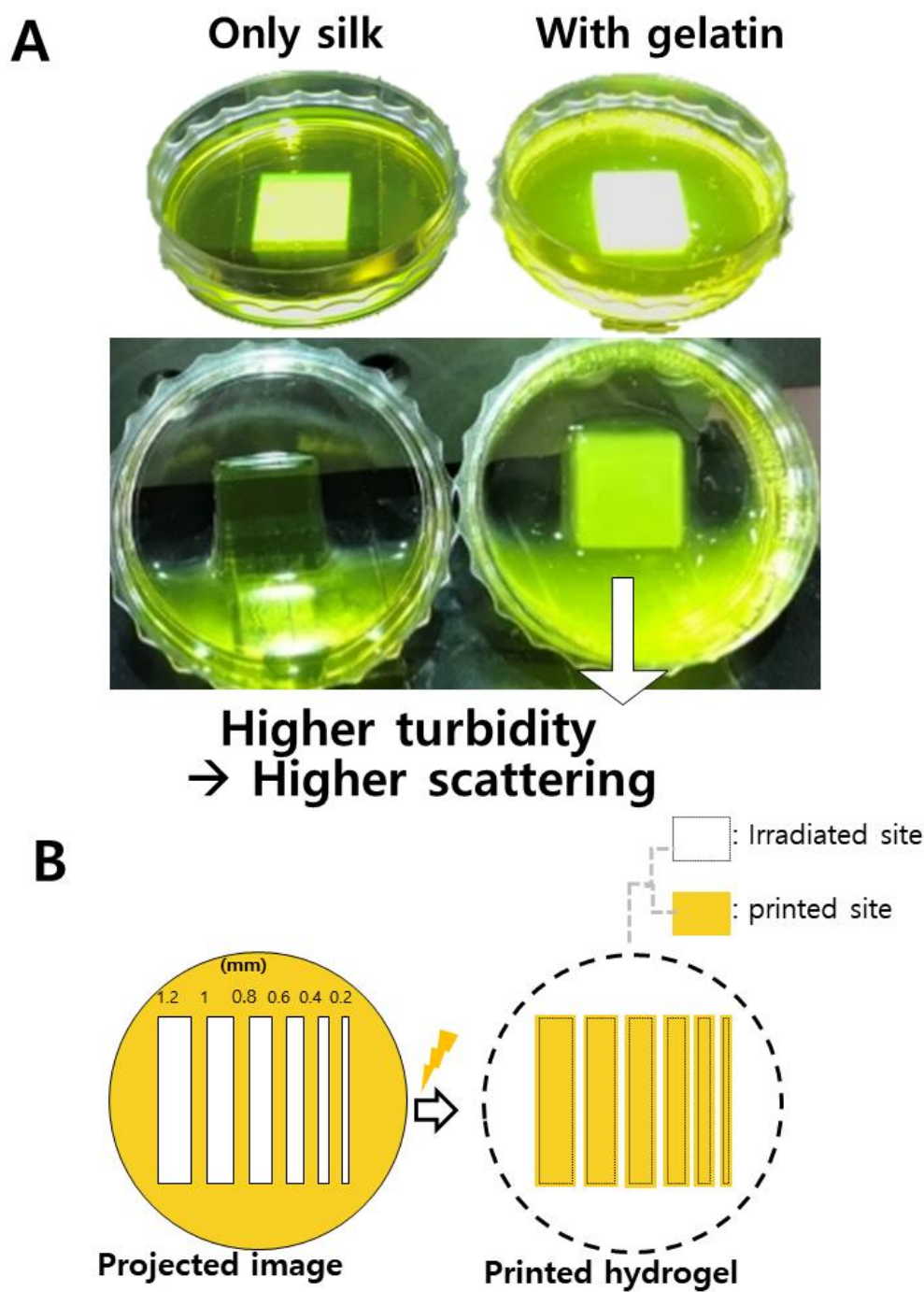


Figure 7 Schematics and examples showing the effect of adding gelatin as a spacer. (A) pictures showing the addition of gelatin increases light scattering. (B) Schematic illustrating the resolution degradation that occurs during printing.

잉크에 주는 영향을 3차원 구조의 축소 방지와 2차원 프린팅 정확도 저하의 두 가지 측면으로 나누어 연구를 진행하였다.

4.2.1. 결정화의 감소 및 구조의 축소 방지

4.2.1.1. 단백질 복합체의 2차 구조 분석(ATR-FTIR)

각 S/G 조성으로 제작된 하이드로젤에 대하여 FTIR을 통해 단백질 2차 구조를 분석했으며 이를 **Figure 8**로 정리하였다. 모든 경우에서 베타-시트의 C=O stretch를 대표하는 1620 cm^{-1} 주변부의 피크가 나타난 것으로 보아 37°C PBS에서 72 시간 보관하였을 때 모든 조성의 하이드로젤에서 베타-시트가 형성되었음을 확인하였다. 한편 젤라틴을 첨가함에 따라 실크 피브로인의 불규칙 코일 또는 단백질의 amide I 구조를 대표하는 1650 cm^{-1} 의 피크가 증가하는 것을 확인하였다. 실크 피브로인에 또 다른 단백질인 젤라틴을 복합화함에 따라 생기는 결과이다. 또한, $1600 \sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 범위에서 피크 분리를 통한 전체 구성 단백질의 2차 구조 분석을 통해서 베타-시트의 함량(%)을 구할 수 있었으며(**Figure 9A**) 이를 **Table 2**로 정리하여 나타내었다. S2G0, S4G0, S6G0의 결과를 비교해 보았을 때(**Figure 9B**) 피브로인의 농도가 높아짐에 따라 베타-시트의 함량이 높아지는 경향을 보였다. 실크 피브로인의 농도가 높아질수록 같은 부피 내에서 더 밀집하게 모여있기 때문에 베타-시트의 형성 또한 더 쉽게 일어났기 때문이다. 젤라틴의 첨가 시 모든 실크 피브로인 농도에서 베타-시트의 함량이 줄어드는 결과를 나타내었다. 하지만 젤라틴 첨가에 따라 네트워크를 이루는 단위 부피 당 amide I의 피크 면적이 증가하며 베타-시트에 해당하는 피크의 크기가 상대적으로 줄어들었을 것이다. 실크 피브로인 용액에 메탄올을 처리하여 결정화를 유도함으로써 제작된 필름에 유연성을 부여하기 위해 젤라틴을 물리적으로 복합화한 연구가 보고되었다. 이 때, 젤라틴의 첨가가 실크 피브로인의 베타-시트와 같은 2차 구조에는 영향을 주지 않았다. 하지만 친수성을 띠는 젤라틴이 베타-시트가 소수성 상호작용을 통해 패킹되는 것을 방지하며 결정화도를 감소시키는 결과를

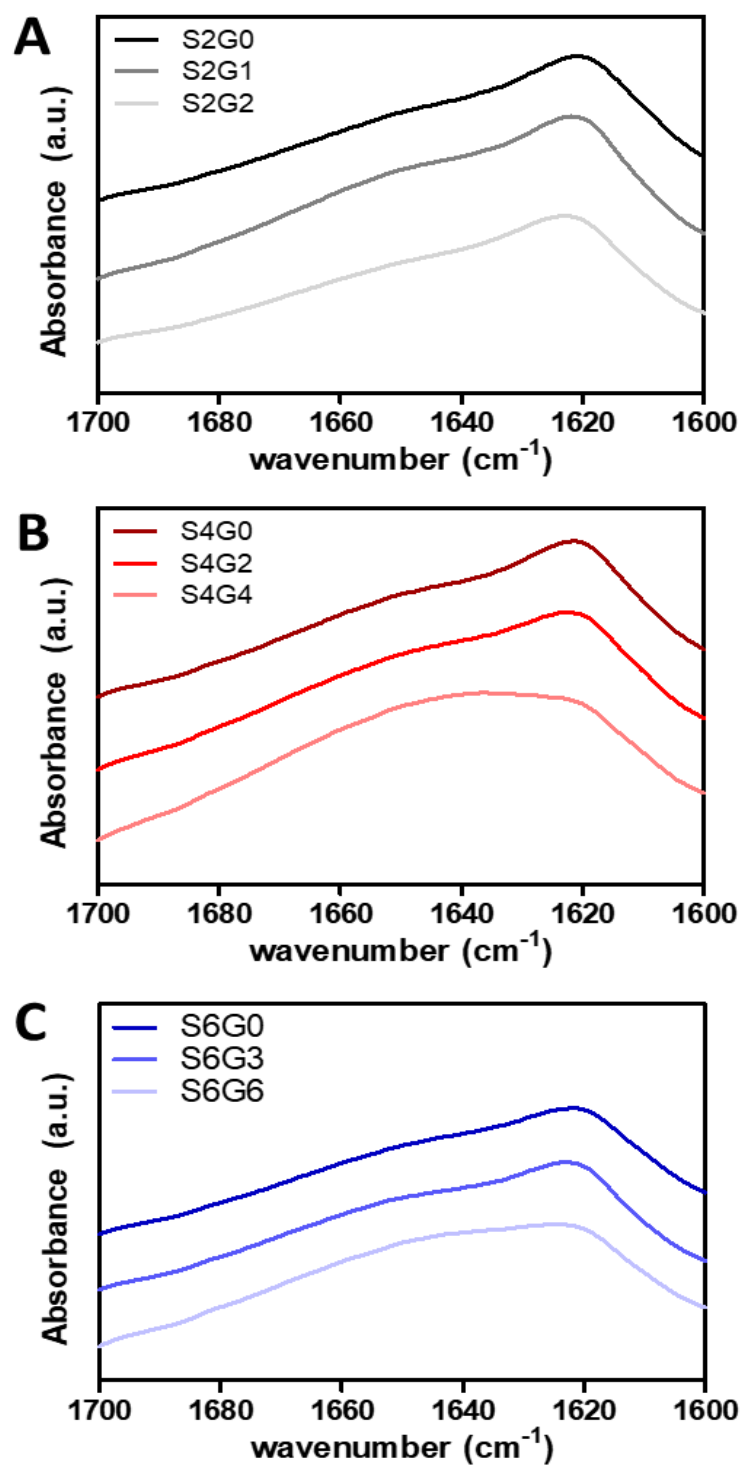


Figure 8 FRIR spectra according to silk concentration (A) 2%, (B) 4%, (C) 6% and gelatin content.

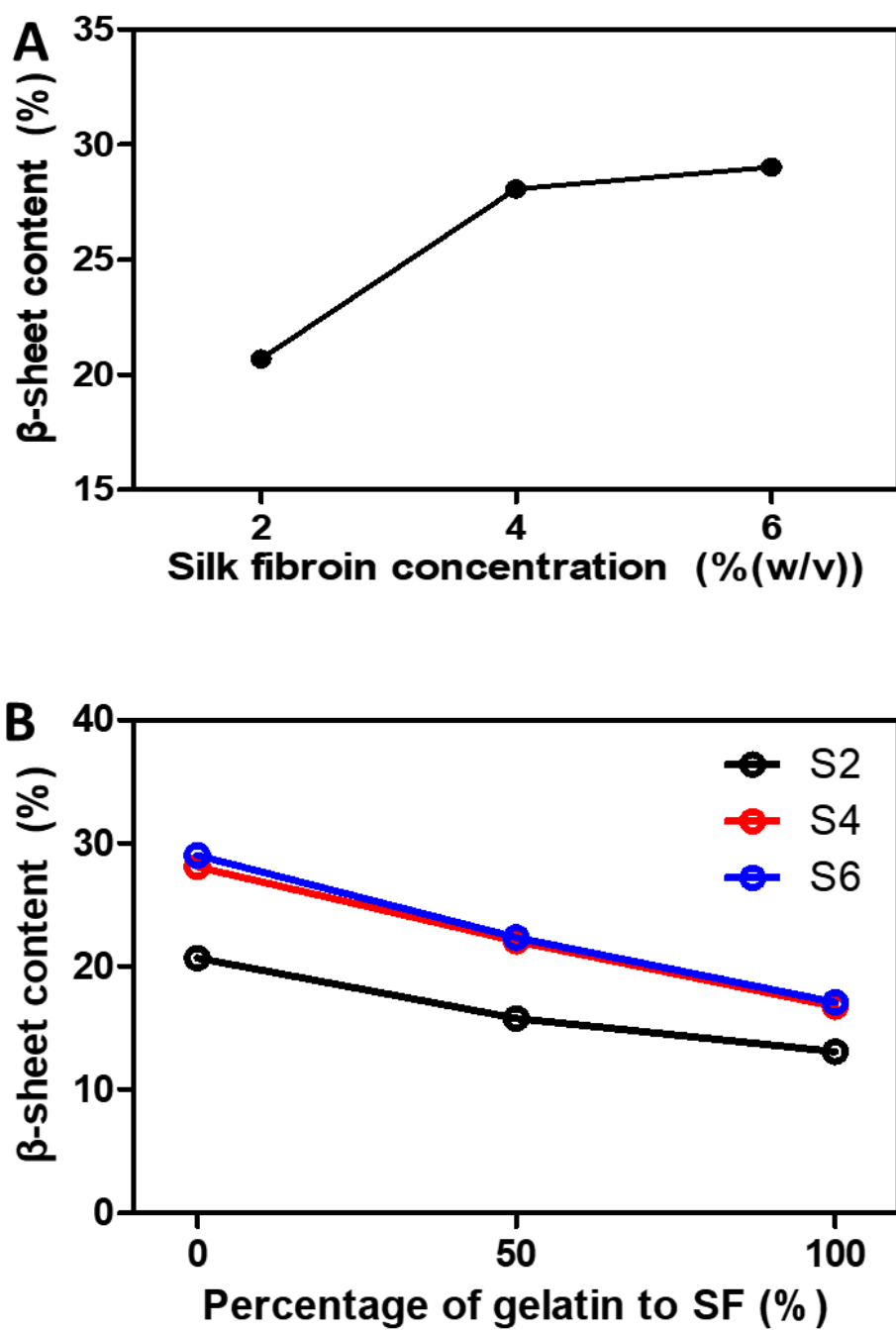


Figure 9 The difference in β -sheet content for various compositions of ink. (A) Calculated β -sheet content of hydrogel fabricated with S2G0, S4G0, S6G0. (B) Calculated β -sheet content according to gelatin concentration at 2, 4, 6%(w/v) silk fibroin concentration.

Table 2. Percentage of β -sheet peaks area relative to random coils

S2G0	S2G1	S2G2
20.69	15.77	13.09
S4G0	S4G2	S4G4
28.07	22.03	16.74
S6G0	S6G3	S6G6
29.03	22.34	17.08

보였다. Figure 8과 Figure 9의 결과를 종합하여 보았을 때, 젤라틴의 첨가로 인해 단위 부피 당 결정 영역의 형성 정도가 줄어들었음을 확인할 수 있다. 즉, 친수성을 띠는 젤라틴이 실크 피브로인의 베타-시트 형성 및 결정화가 진행될 때, 베타-시트의 사이사이에 끼어들어 그들 간의 패킹 구조를 형성하는 것을 막아 밀도의 급격한 증가를 방지한 것이다[72].

한편, Raia, Nicole R., et al.[21]의 연구에서 실크 피브로인에 화학적으로 가교된 히알루론산이 실크 피브로인의 2차 구조 형성에 관여하여 베타-시트 형성을 지연시키고 형성 정도 또한 감소시켰다. 히알루론산을 실크 피브로인에 물리적으로 복합화하였을 때 자가조립(self-assembly)을 촉진시키며 오히려 결정화를 유도하였다는 선행 연구 결과와 달리, 이들의 연구에서는 히알루론산이 화학적으로 복합화되어 실크 피브로인 주사슬의 분리를 강제하고, 네트워크 구조 내에 물을 붙잡아둠으로써 결정화 방지 이전에 베타-시트 형성 또한 방지하는 원리이다. 본 연구에서도 젤라틴이 실크 피브로인에 다이타이로신 결합을 통해 화학적으로 복합화되었음을 확인하였으며, 같은 원리로 베타-시트의 형성을 감소시켰을 것이라고 기대한다. 실크 피브로인 2차 구조에의 젤라틴의 정확한 영향은 추후 연구를 통해 더 밝혀져야 할 것이다.

4.2.1.2. 무게와 부피의 변화 분석

프린팅된 하이드로젤의 변형 거동을 살펴보기 위해 37°C PBS에서 96 시간 동안 침지하며 24 시간 간격으로 부피를 측정해 변화를 확인하였다(Figure 10). 모든 S/G 조성의 잉크로 제작된 하이드로젤에 대하여 72 시간까지는 부피의 감소 및 증가 변형이 크게 일어나나, 72 시간 이후에는 변화가 현저히 적어지는 것을 알 수 있었다. 따라서 이후의 실험에서는 하이드로젤이 72 시간이 지나면 평형 팽창 상태에 도달한다고 가정하도록 한다. S2G0, S2G1, S4G0, S6G0 하이드로젤은 초기 48 시간 동안 부피가 감소하는 거동을 보였다. 이는 실크

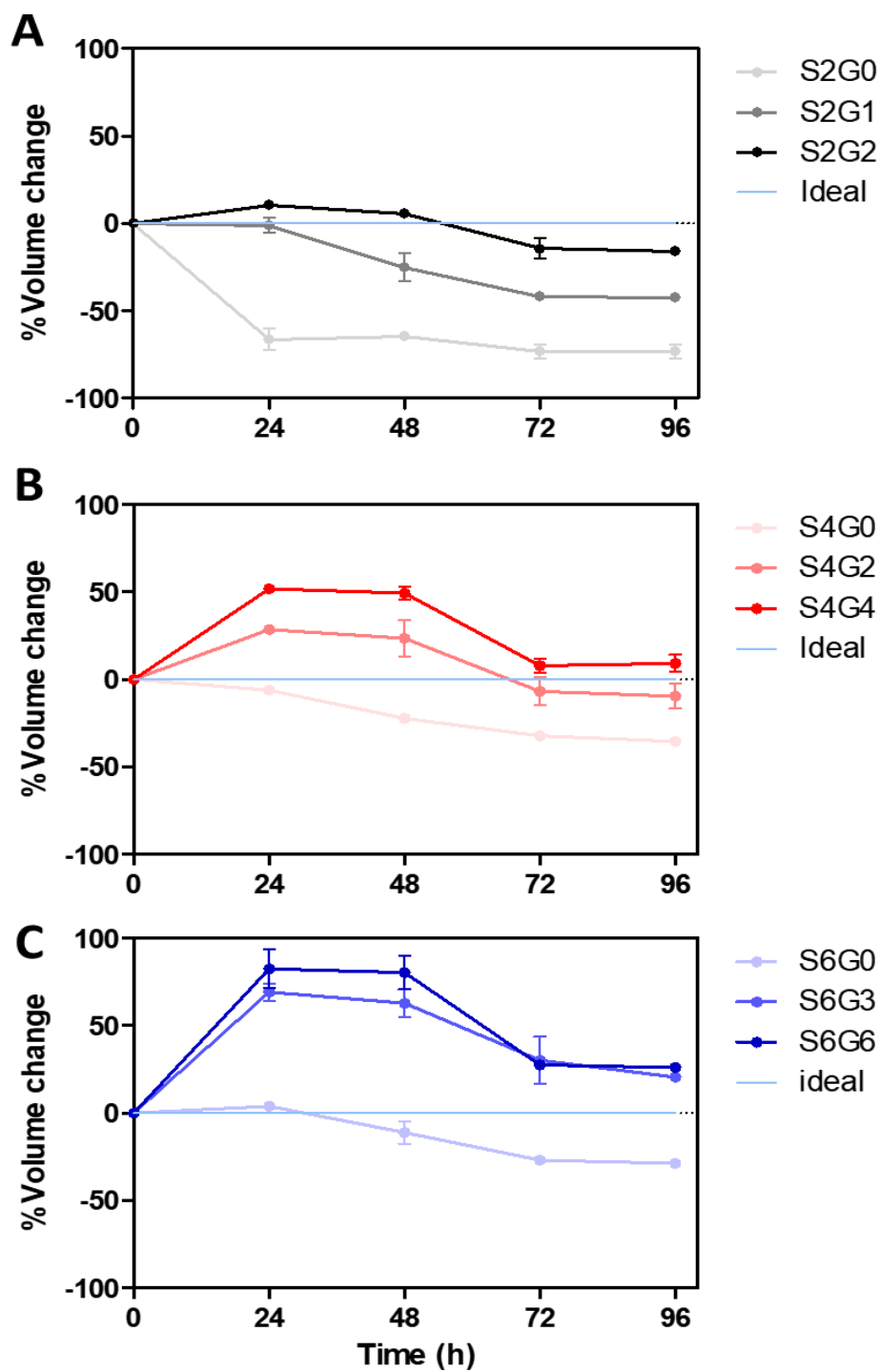


Figure 10 Graphs of volume change in 37 °C PBS of (A) 2 (B) 4 (C) 6%(w/v) silk fibroin concentration. Each value is expressed as a percentage of the mass for the initial state (0 h). (n = 4)

피브로인의 베타-시트 형성 및 소수성 상호작용에 의한 패킹에 의해 하이드로젤의 소수성 부분이 밀집되며 결정화되는 것에 따른다. 반면 S2G2, S4G2, S4G4, S6G3, S6G6 에서는 부피가 증가하였다가 다시 감소하는 거동을 보였다. 이에 대한 이유를 실크 피브로인의 결정화에 의한 구조 축소를 향한 힘, 하이드로젤 구성 고분자가 물을 끌어옴에 의해 유도되는 실크 피브로인 체인의 이완을 향한 힘의 대립으로 해석해보았다.

열역학적인 상용성에 의해 고분자 사슬과 용매 분자는 상호작용을 선호한다. 따라서 하이드로젤 네트워크 구조는 열역학적으로 유도된 팽창력과 가교 구조의 수축력에 의해 균형을 이루게 된다. 팽창 후 수축 거동을 보이는 하이드로젤들은 초기에 젤라틴 분자가 실크 피브로인 분자의 사이사이에 존재하며 소수성 베타-시트끼리의 상호작용을 방지하며, 젤라틴이 가진 친수성에 의해 물 분자와 상호작용하며 네트워크 구조에서 팽창력이 우세하도록 한다. 이때, 실크 피브로인은 랜덤 코일, 알파 헬릭스, 베타 턴 등의 유연한 2차 구조를 가지며, 이에 따라 체인이 이완될 가능성 또한 존재하게 된다. 가교에 의해 경직된 형태를 띠게 되었지만, 이와 같은 가교된 고분자 사슬들이 이완됨으로써 젤라틴에 의해 끌려 들어온 물 분자들이 자리할 수 있는 공간이 존재하므로 물의 유입에 따른 전체 구조의 팽창이 일어날 수 있다. 그 후, 48 시간 이후에는 고분자와 물 간의 상호작용이 중간 평형 상태에 이르며, 베타-시트의 밀집한 구조 형성에 따른 수축력이 우세하게 되어 부피의 감소가 일어난다. 72 시간에서는 실크 피브로인의 결정화에 따른 구조의 강직도에 의해 구조가 고정되며, 팽창력과 수축력이 평형을 이루게 되는 것으로 보인다. 물의 유출과 유입에 의한 하이드로젤의 질량의 변화(**Figure 11**) 또한 부피의 변화와 같은 경향을 보였다.

한편, 실크 피브로인의 농도가 증가함에 따라서도 부피와 질량의 감소가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 앞선 ATR-FTIR 결과에서는 실크 피브로인의 농도가 높을수록 베타-시트의 형성이 더 많이

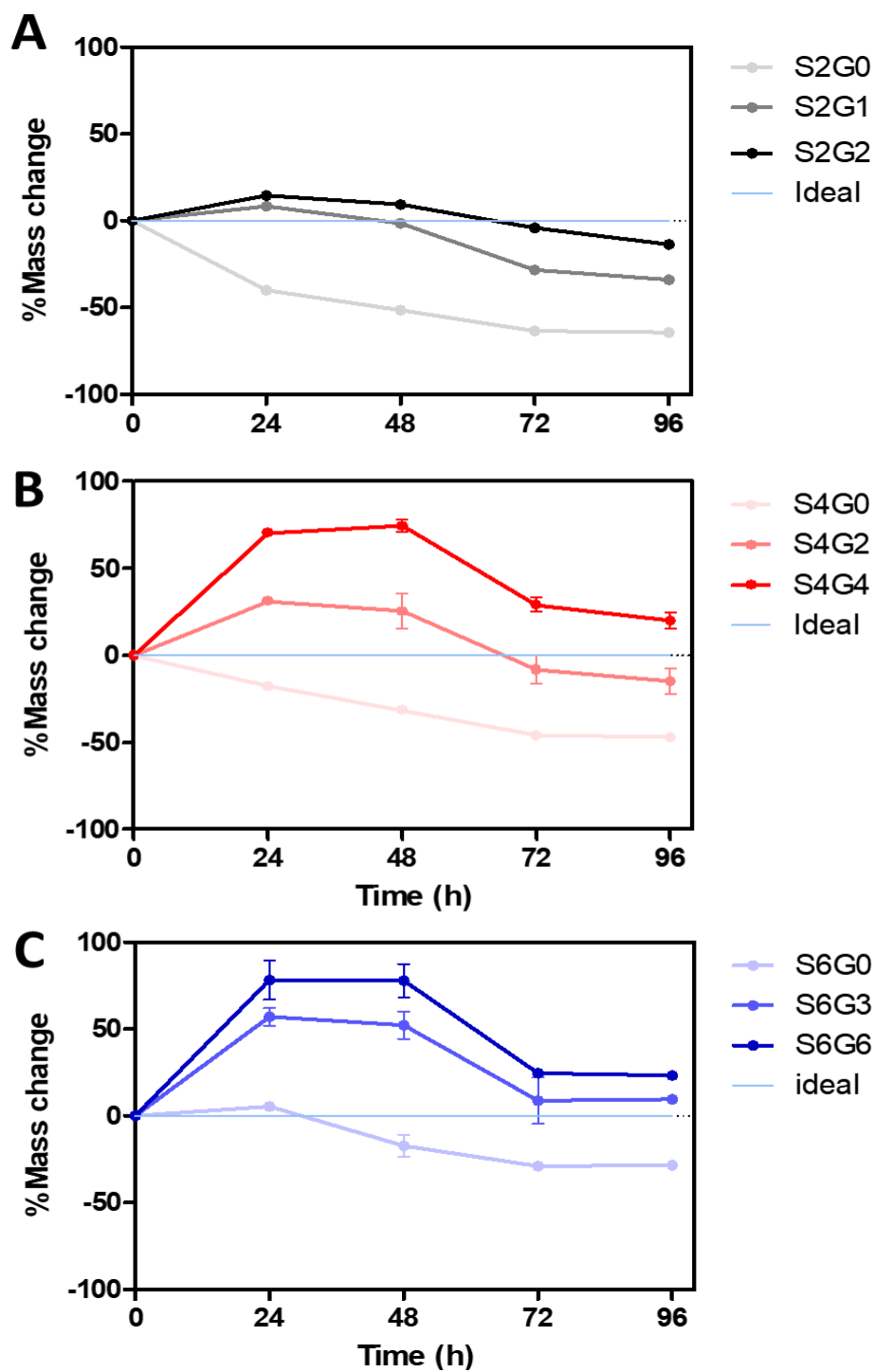


Figure 11 Graphs of mass change in 37 °C PBS of (A) 2 (B) 4 (C) 6%(w/v) silk fibroin concentration. Each value is expressed as a percentage of the mass for the initial state (0 h). (n = 4)

일어나는 것으로 나타났으나, 동일 부피 내에서 고분자의 양이 증가함에 따라 결정화에 의해 구조가 축소될 수 있는 공간이 줄어들기 때문에 전체적인 구조의 축소는 더 적게 일어났을 것이다. 하지만 총 고분자 농도가 같은 S4G0와 S2G2, S6G0와 S4G2의 결과를 서로 비교해 보았을 때 젤라틴 스페이서의 필요성이 부각 된다. 젤라틴을 첨가한 것이 실크 피브로인만 존재하는 하이드로젤보다 수축의 방지 효과가 좋은 것을 확인할 수 있기 때문이다. 또한, 실크 피브로인의 결정화는 물성의 극적인 변화를 수반하게 되며 이에 대한 조절 또한 어려우므로 젤라틴 스페이서의 사용이 필요하다. 한편, S2G1은 젤라틴을 첨가하였음에도 초기 보관 상태에서 축소하는 거동을 보였다. 전체 고분자 농도가 낮은 경우는 비교적 성긴 구조를 형성하며 수축력에 의해 축소할 수 있는 공간이 팽창력을 배제할 수 있을 정도로 커다란 요소로 작용한다. 즉, 젤라틴이 존재하지만, 친수성에 의한 물의 유입에 의한 팽창력보다 베타-시트 사이의 상호작용에 따른 수축력이 더 우세하게 된다. 반면 전체 고분자 농도가 높아 수축할 수 있는 공간이 비교적 적은 경우는 물 분자와의 상호작용에 의한 팽창력이 베타-시트 간의 밀접한 구조 형성에 의한 수축력의 경쟁이 중요 요소로 작용하게 된다.

4.2.2. 2차원 프린팅 정확도에 대한 영향 분석

젤라틴의 첨가에 따른 S/G 잉크의 2차원상의 프린팅 정확도를 확인해보았다. 먼저 각 조성의 잉크에 레이저를 쏘아 빛이 투과하는 모습을 관찰하였다. **Figure 12**에서 젤라틴을 첨가하지 않은 S2G0, S4G0, S6G0 잉크에서는 쪼여준 레이저가 주변부로 번짐 현상이 거의 관찰되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 반면 젤라틴이 첨가된 나머지 잉크에서는 레이저가 더 넓은 띠를 그리며 투과하며 잉크의 주변부로 빛이 번지는 것을 확인하였다. 이처럼 잉크에 쪼여진 빛이 산란 됨에 따라 프린팅 시에도 빛을 쪼여준 부분의 주변부에 광중합이 일어나 원하는 형태와 차이가 나는 결과를 얻게 될 수 있으므로 2차원 적인 프린팅 정확도의 저하가 예상되었다. 따라서 이를 확인하기 위해 200,

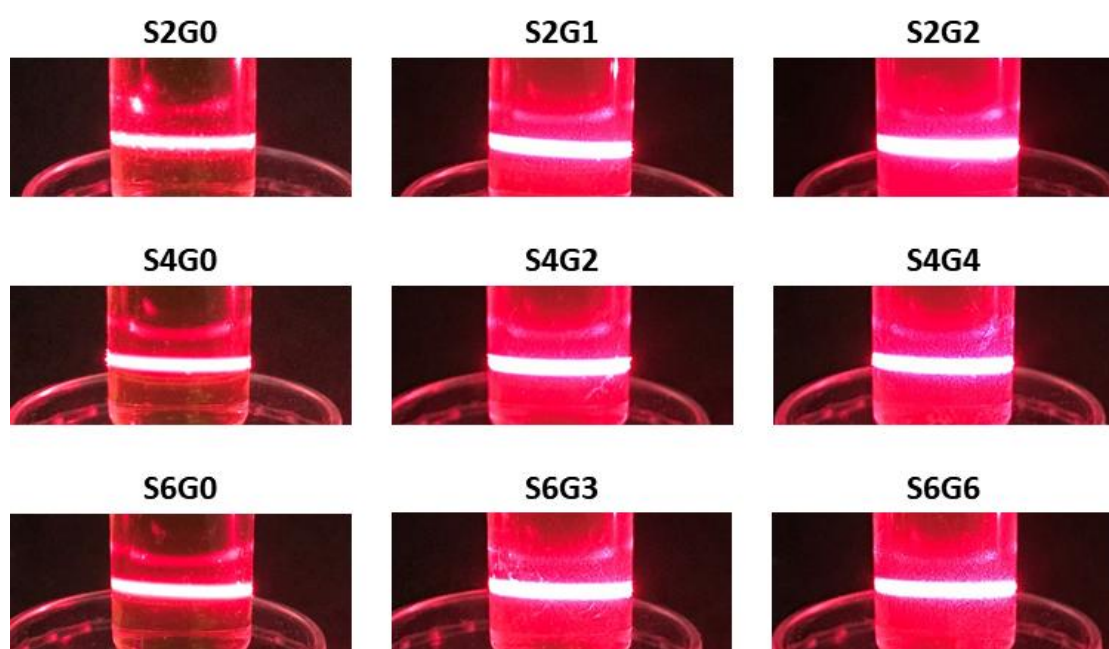


Figure 12. Pictures showing that the addition of gelatin increases the scattering of laser irradiated to ink.

400, 600, 800, 1000, 1200 μm 두께(intended size)의 선 형태로 빛을 쪼여주었고, 빛이 쪼여진 자리에 형성된 하이드로젤을 붉은색으로 염색하여 실제 두께(measured size)를 광학현미경으로 관찰하였다(**Figure 13A**). ImageJ를 통한 분석 결과 모든 실크 피브로인 농도에서 젤라틴의 비율이 높아질수록 빛을 쪼여준 부분의 주변부에서 불필요한 광중합이 일어나 더 넓은 부위에서 하이드로젤이 형성되며 프린팅 정확도가 저하되는 것을 확인할 수 있었다(**Figure 13B, C, D**).

이와 같은 정확도의 저하를 용액 상태에서 젤라틴의 첨가에 따른 실크 피브로인의 입자화가 촉진되기 때문으로 해석하였다. 실크의 방적 공정 중 실크 도프 용액의 조성 및 물리적 상태가 변하게 되는데 이에 대한 pH, 이온 농도, 온도, 외부 자기장 등의 다양한 생리 조건이 실크 피브로인의 자기 조립에 영향을 줄 수 있다[62-64]. Hyo Won Kwak et al. [89]은 실크를 구성하는 두 가지 주요 단백질인 피브로인과 세리신을 언급하며, FTIR 및 XRD의 변화를 통해 피브로인의 자기 조립에 대한 세리신의 효과를 조사하였다. 세리신의 농도가 증가할수록 실크 피브로인의 젤화 및 베타-시트 형성 시간이 지연되며 실크 I의 입체 구조를 선택하게 된다는 것이다. 이처럼 다른 고분자의 존재 또한 실크 피브로인의 2차 구조 또는 자기 조립에 영향을 주며 입자화를 촉진하거나 억제할 수 있다. 젤라틴의 첨가에 따른 실크 피브로인의 입자화에 대한 선행연구는 아직 존재하지 않지만, 음이온이나 음전하를 띤 분자의 존재에 의한 salting out, 또는 실크 피브로인과 다른 분자들과의 수소결합의 형성이 실크 피브로인의 2차 구조 및 자기 조립에 주는 영향에 대한 연구는 활발히 진행되어오고 있다[90-92]. 젤라틴 또한 용액 상태에서 부분적인 음전하를 띠고 있으며 수산화기 아민기 등을 통해 실크 피브로인과 수소결합을 형성할 수 있다. 이에 따라 일부 실크 피브로인의 자기 조립을 촉진하여 부분적인 입자화가 진행되었고, 형성된 입자들에 의해 S/G 용액의 빛에 대한 산란도가 증가하는 것으로 추정할 수 있으며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

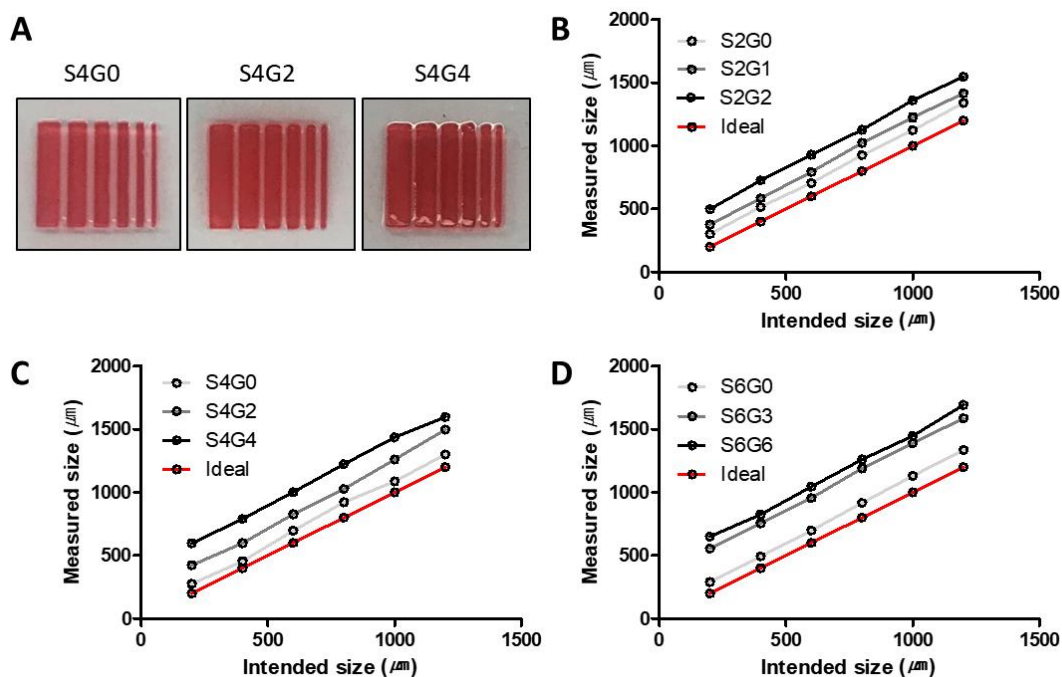


Figure 13. (A) Pictures that showing the difference in hydrogel formed in different gelatin concentration when a line of varying thickness is applied. (B, C, D) Graphs comparing intentional line thickness and measured value of formed hydrogel thickness. (n = 4)

4.3. 하이드로젤의 특성 분석

4.3.1. 압축 시험을 통한 기계적 물성 분석

초기 상태(**Figure 14B**)에서 고분자의 양이 증가함에 따라 압축 탄성률 또한 증가하는 경향을 보인다. 실크 피브로인만을 사용했을 경우 0.2 ~ 0.6 kPa의 압축 탄성률을 보이나, 젤라틴을 첨가할 경우 1.3 kPa까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 37°C PBS에서 72 시간 보관 후(**Figure 14C, D**)에는 S2G0, S4G0, S6G0의 압축 탄성률이 크게 증가하며 20 ~ 80 kPa로 100배 가까이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 베타-시트 사이의 강한 상호작용은 실크 피브로인의 우수한 기계적 성질 및 구조 안정성에 기여 한다[55, 93]. 젤라틴이 복합화된 나머지 하이드로젤에서는 압축 탄성률이 유지되거나 감소한 것으로 나타났으며, 젤라틴의 첨가량이 증가할수록 압축 탄성률이 낮아지며 초기 상태와 반대의 결과를 보여주었다. 이와 같은 결과는 젤라틴이 실크 피브로인 베타-시트 구조의 사이사이에 끼어 들어가 베타-시트의 상호작용을 막으며, 앞선 결과에서 보여주는 함수율의 증가로 인해 덜 경직된 구조를 형성하는 것에서 기인하는 것으로 보인다. 압축 탄성률 측정 과정에서 S4G0의 초기 상태(**Figure 15A**), 젤라틴이 포함된 S4G2 하이드로젤의 보관 후 상태(**Figure 15B**), 젤라틴이 포함되지 않은 S4G0 하이드로젤의 보관 후 상태(**Figure 15C**)의 회복력을 보여주는 자료를 얻을 수 있었다. 결정화가 진행되지 않은 초기 상태의 하이드로젤과 젤라틴 스페이서가 베타-시트 사이의 상호작용을 방제한 하이드로젤에서는 압축 후 원래 상태로 되돌아오는 회복 성질을 보였으나, 젤라틴을 복합하지 않은 실크 피브로인 하이드로젤에서는 결정화에 의해 탄성 회복력이 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

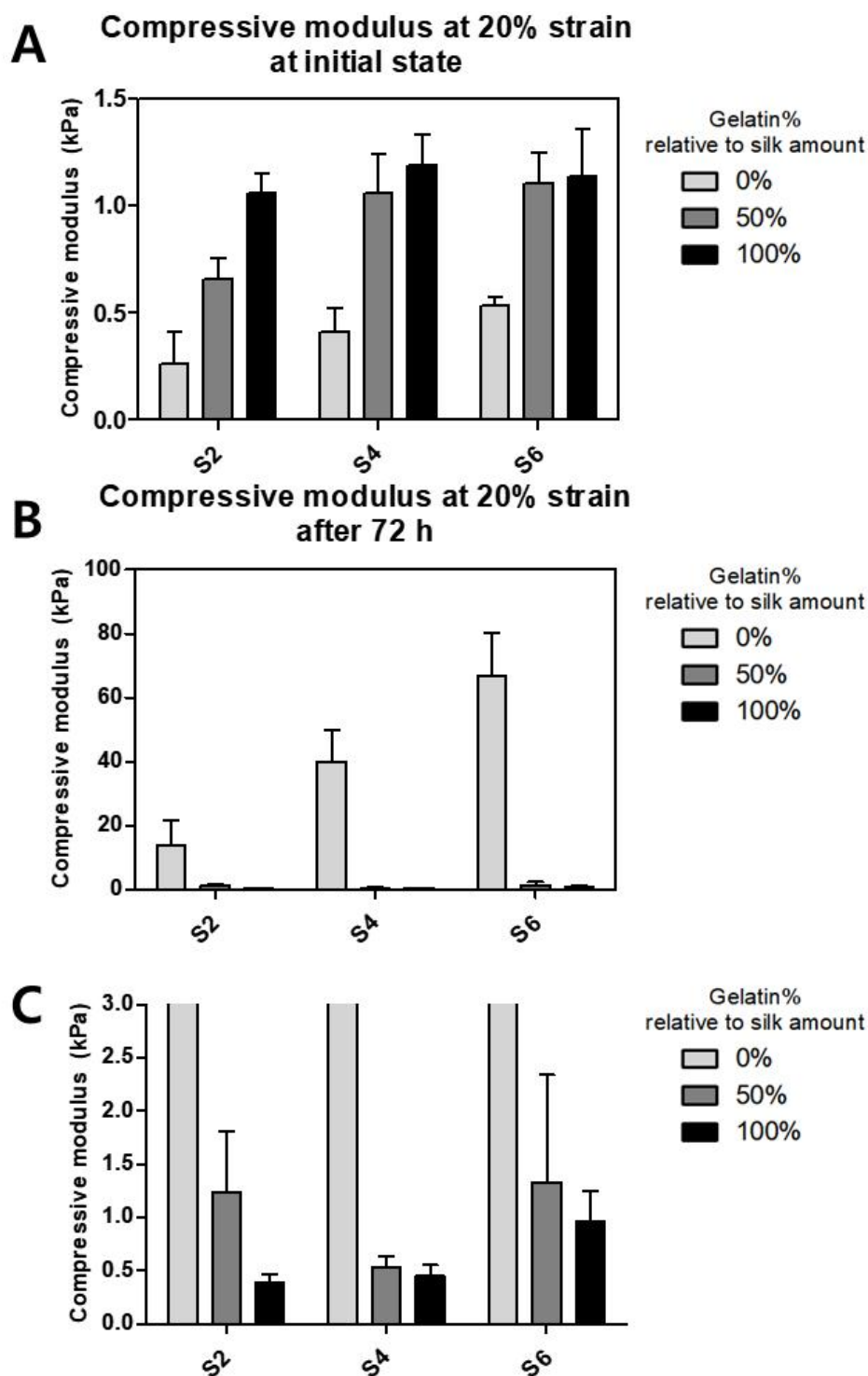


Figure 14. (A) Compressive modulus at 20% strain of initial state hydrogel. (B) Tangent modulus at 20% strain of the hydrogel after 72 h storage in 37 °C PBS and (C) its enlarged version. (n = 4)

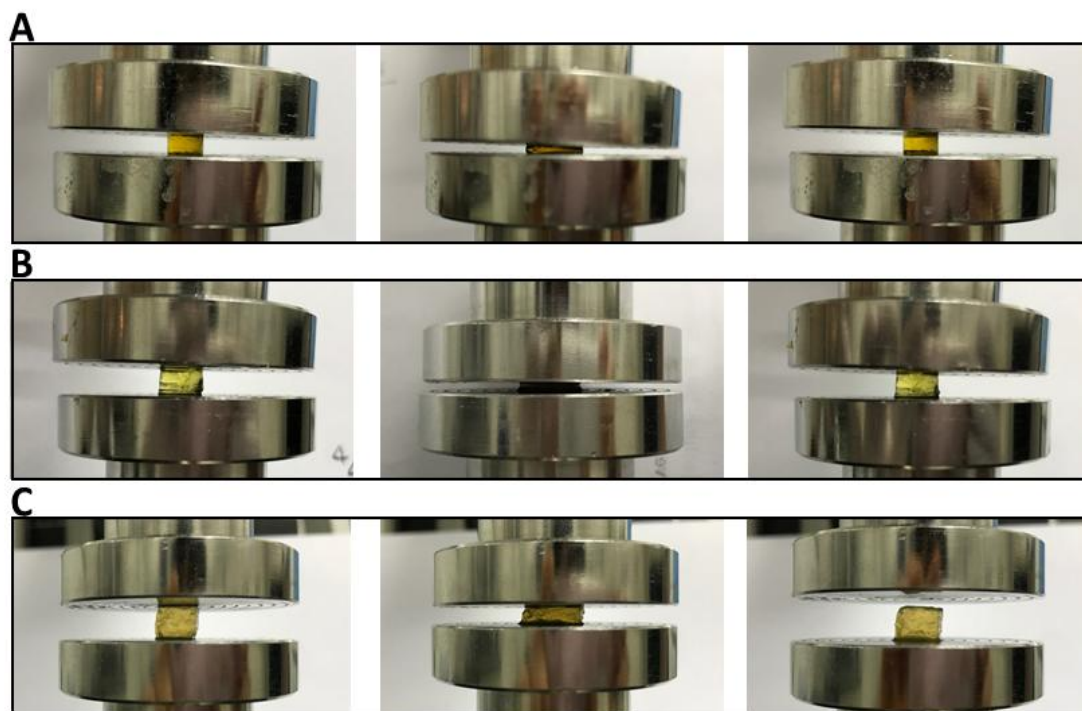


Figure 15. Pictures showing the recovery property of the hydrogel prepared. (A) Hydrogel in initial state. (B) Hydrogel in which water extraction is prevented by gelatin spacer. (C) Hydrogel without added gelatin that lost recovery property due to formation of beta sheet.

4.3.2. 평형 함수율 / 팽창비

하이드로젤의 평형 상태 함수율(EWC)을 **Figure 16A**에 나타내었다. 하이드로젤 네트워크 구조는 열역학적으로 고분자 사슬과 용매 분자의 상호작용을 선호하게 되며 용매 분자를 구조 내부로 끌어들이며 팽창한다. 이렇게 얻어진 열역학적으로 유도된 팽창력은 가교 구조의 수축력에 의해 균형을 이루며 평형 상태에 도달하게 된다. 본 논문의 광가교된 실크 피브로인 구조에서는 실크 피브로인의 베타-시트 형성에 의해 유발되는 구조의 경직도 증가가 수축력에 해당한다. 앞선 부피/질량 변화 실험에서 72 시간 이후의 변형이 거의 일어나지 않음을 확인하였으며, 제조된 하이드로젤들의 평형 도달 시간을 72 시간이라 가정하였다. 각 S/G 농도의 하이드로젤을 제조 후, 37°C PBS에 72 시간 침지시켜 평형 상태에 도달하게 했으며 이에 대한 질량을 측정하였다. 그 후 하이드로젤을 완전히 건조하여 건조 질량을 얻어내었다.

이들을 통해 평형 상태의 함수율(EWC)과 팽창비(swelling ratio)를 계산해내었다. **Figure 15A**에서 평형 상태 함수율은 모든 S/G 조성에서 85% 이상을 보였다. 실크 피브로인의 농도가 높아질수록 함수율은 조금 낮아지는 경향을 보였으며, 같은 실크 피브로인 농도에서는 젤라틴의 복합 비율이 증가할수록 함수율이 증가하는 것으로 나타났다. 젤라틴에 의해 구조의 축소가 방지되고 물 분자가 하이드로젤 네트워크 구조로 더 들어올 수 있게 된다는 앞선 결과를 뒷받침하는 결과이다. **Figure 16B**에서 팽창비 또한 EWC와 같은 경향성을 보인다.

4.3.3. 젤 분율 분석

각 잉크에 대한 고분자의 가교 참여도를 확인하기 위해 젤 분율을 측정하였다. **Figure 17A**에서 S2를 제외한 경우에서 모두 젤라틴의 비율이 증가할수록 젤 분율이 감소하는 경향을 보였다. **Figure 17B**에서는 각 잉크 조성에 대하여 30 μ l의 부피로 하이드로젤을 제작하여 미반응 물질 및 염을 제거한 후 건조한 질량을 나타내었다. 그 결과 젤라틴을 첨가할수록 건조 질량의 증가가 뚜렷하게 나타난 것을

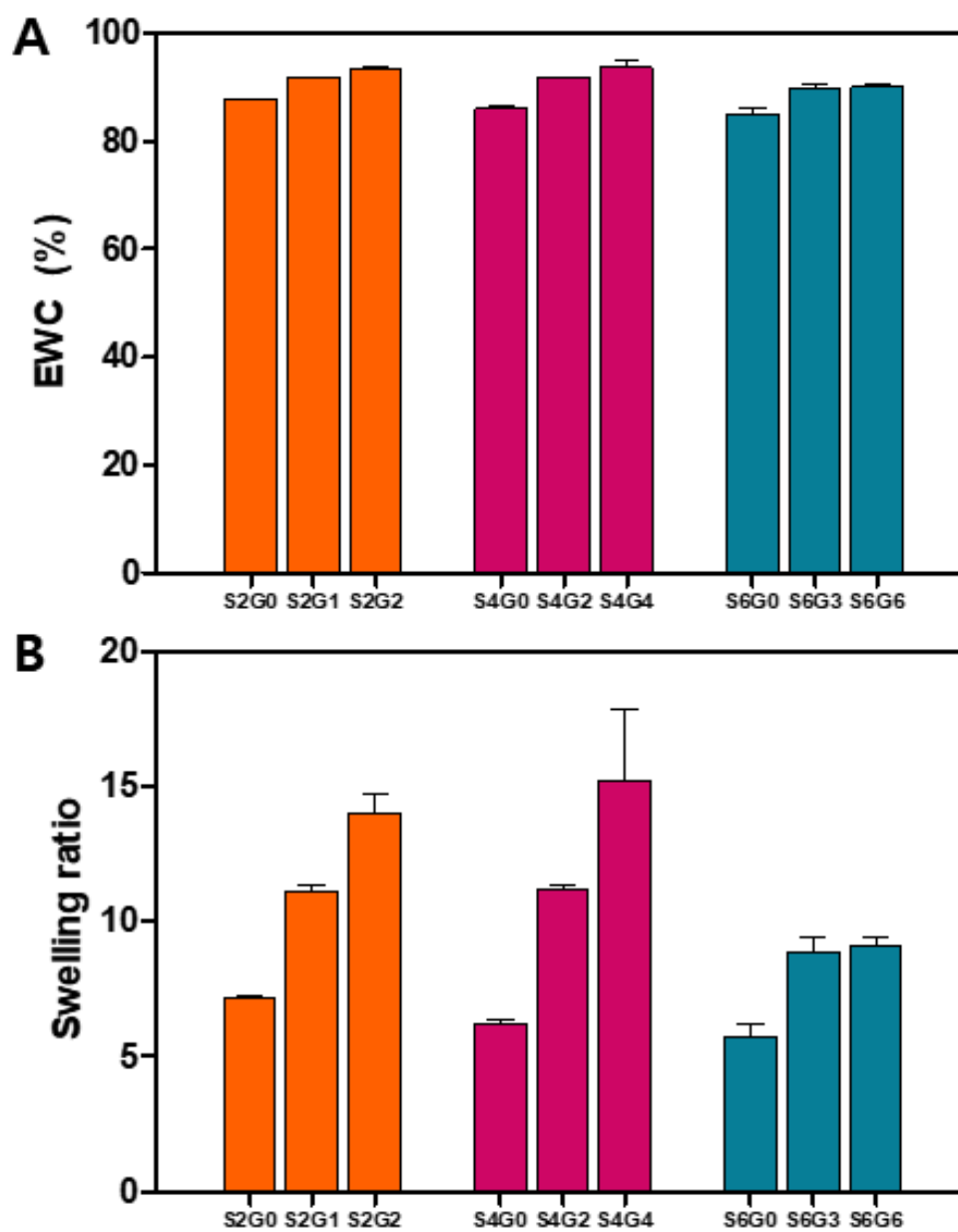


Figure 16. (A) Equilibrium water content of hydrogels. (B) Equilibrium mass swelling ratio of hydrogels. (n = 4)

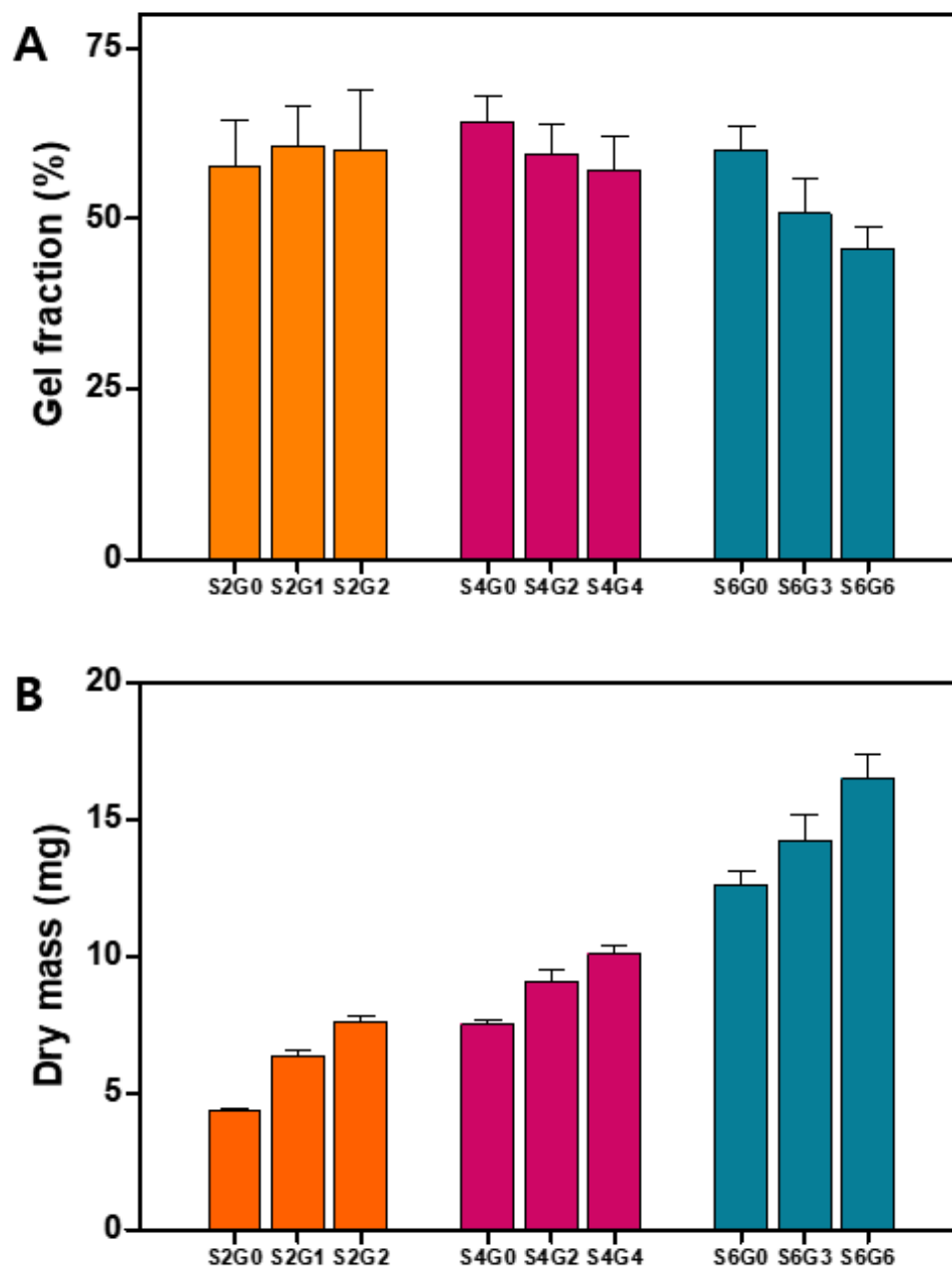


Figure 17. (A) Gel fraction of each hydrogels. (B) Dry mass of hydrogel prepared with 30 μ l precursor solution.

확인하였다. A와 B의 결과를 종합해보았을 때 전구 용액에 존재하는 젤라틴의 젤화 효율이 실크 피브로인의 젤화 효율보다 낮으며, 광가교를 진행한 후 미반응 물질을 제거하는 과정에서 빠져나오는 고분자의 비율이 실크 피브로인에 비해 젤라틴이 훨씬 높다는 것을 유추할 수 있었다. 하지만 다이타이로신 결합의 형성을 형광 측정을 통해 확인한 앞선 결과에서 볼 수 있듯이 젤라틴 또한 반응에 참여하며 네트워크 구조를 이루어 건조 질량의 증가가 일어난 것으로 볼 수 있다.

4.3.4. 하이드로젤 표면 구조 특성

S4G0과 S4G2 잉크로 제작된 하이드로젤의 단면 미세구조를 관찰하기 위해 300배율로 관찰한 FE-SEM 촬영의 결과를 **Figure 18**로, 5000배율로 관찰한 결과를 **Figure 19**로 나타내었다. Figure 18에서 DLP 프린팅을 통한 하이드로젤의 적층 과정에서 의도한 대로 200 μm 의 층이 잘 형성되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 37°C에 72 시간 보관 후에 젤라틴이 첨가되지 않은 S4G0 하이드로젤에서는 구조의 축소가 일어나 층 두께가 줄어들었으나 젤라틴이 첨가된 S4G2에서는 층 두께가 유지된 것을 확인할 수 있었다. 더 미세한 구조를 확인한 Figure 19에서는 하이드로젤을 형성한 직후(0 시간)의 단면을 촬영한 것은 젤라틴을 첨가하였을 때 기공의 크기가 작아지는 것을 확인하였다. 이는 전체적인 고분자의 함량이 높아짐에 따른 것으로 구조의 축소가 일어나지 않은 상태에서 S와 G의 함이 4%에서 6%가 되었기에 구조의 밀도가 증가하였기 때문으로 보인다. 반면, 37°C에 72 시간 보관 후 단면을 촬영한 사진에서는 젤라틴을 첨가하지 않은 S4G0에서는 초기 구조에 비해 기공의 크기가 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었으며, 부분적으로 두꺼운 벽이 형성된 것을 확인할 수 있었다. 이는 소수성 부분인 베타-시트 형성 부위가 패킹 된 구조를 형성한 것으로, 이로 인해 기공의 개수가 줄어들어 전체적인 부피의 감소를 일으켰을 것으로 보인다. 반면 S4G2의 단면은 초기 구조와 72 시간 후의 구조에서 기공의 크기가 비교적 적은 변화를 보였으며, 벽의 형성 또한 적게

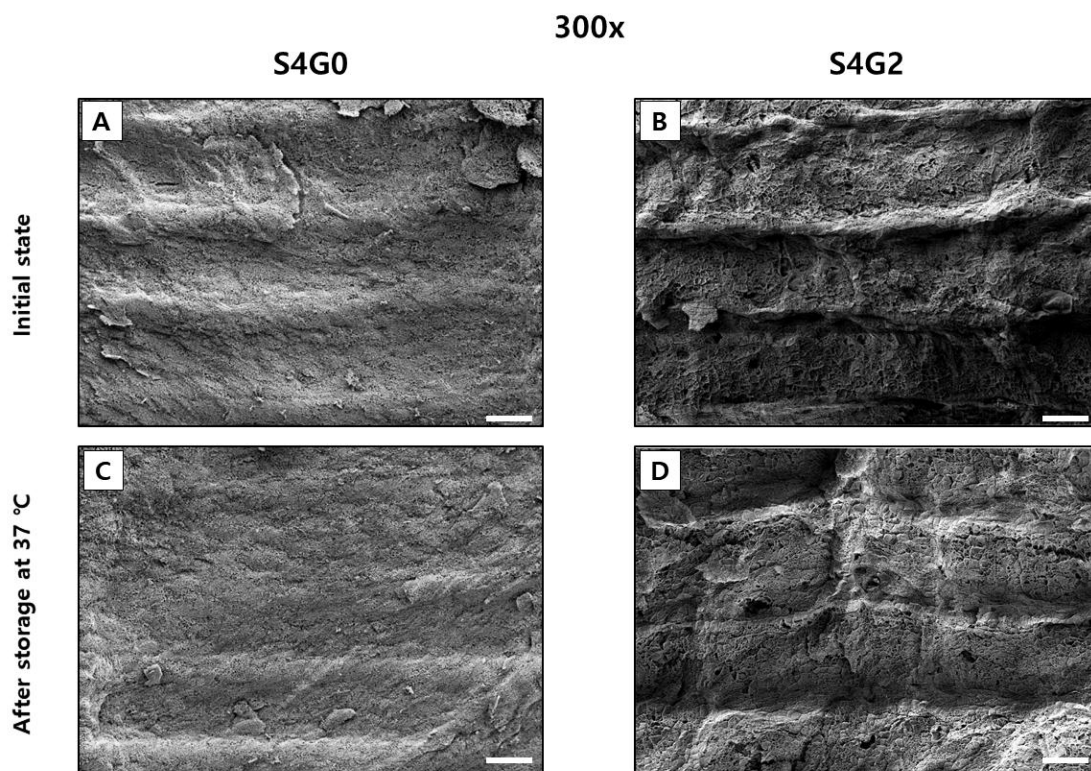


Figure 18. FE-SEM images of cross-sectional images of initial state of (A) S4G0, (B) S4G2 and β -sheet induced state of (C) S4G0, (D) S4G2. (Scale bar : 100 μm)

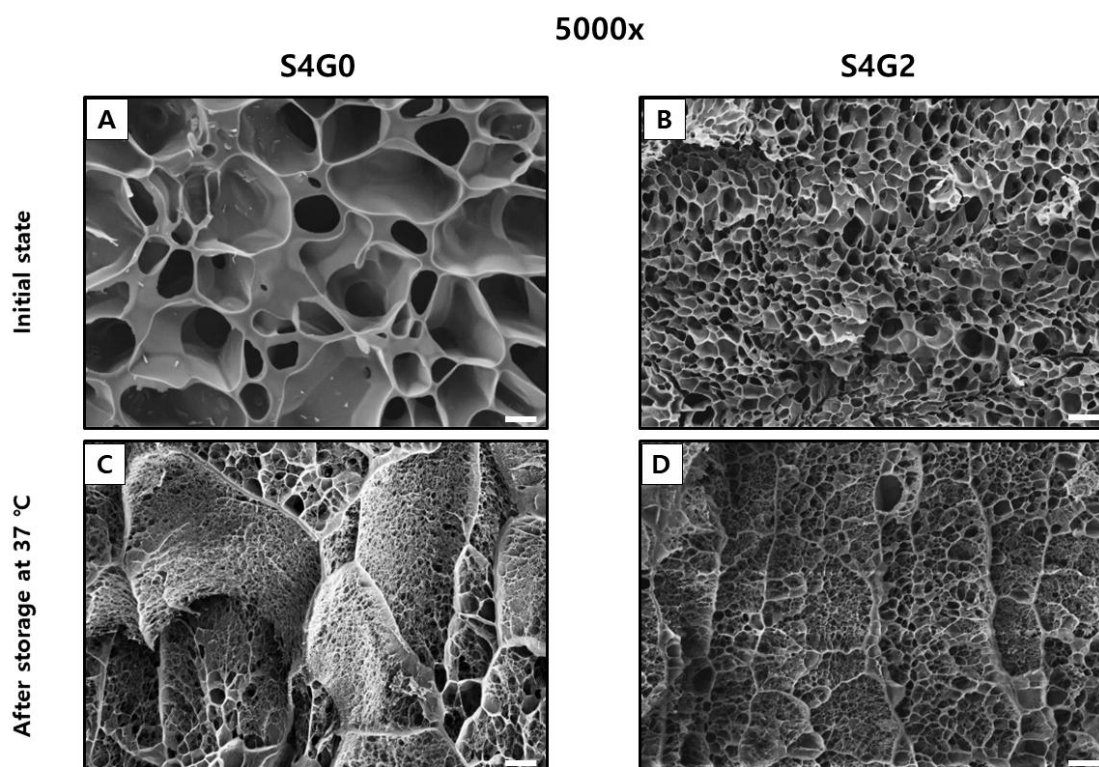


Figure 19. FE-SEM images of cross-sectional images of initial state of (A) S4G0, (B) S4G2 and β -sheet induced state of (C) S4G0, (D) S4G2. (Scale bar : 4 μm)

나타났다. 이는 베타-시트 구조의 형성 및 패키징에 의한 부피 축소에 대한 앞선 실험 결과들에 상보적인 결과를 나타내는 것이다.

4.3.5. 세포 활성 분석

각 조성의 잉크에 대한 세포의 활성을 분석하기 위해 Live/Dead 실험을 진행하였고, 형광현미경을 통해 각 시료에 대하여 서로 다른 세 부분의 세포 활성을 관찰해 (살아있는 세포 수) ÷ (전체 세포 수) × 100 (%)의 평균값을 측정하여 **Figure 20**으로 나타내었다. 1일 배양하였을 경우 생존율은 50 ~ 70%로 나타났으며 각 고분자의 농도에 따른 세포 활성의 경향성은 뚜렷하지 않았다. 7일 배양한 후에는 모든 실크 피브로인 농도에서 젤라틴의 비율이 증가할수록 세포의 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 1일 차에 비하여 젤라틴이 첨가되지 않은 S2G0, S4G0, S6G0에서는 7일 차의 세포 생존율이 줄어들었으며 15 ~ 35%의 낮은 생존율을 보였다. Xiaoqin Wang, et al.[63] 에 따르면 실크 피브로인 결정화에 따른 하이드로젤 구조의 축소가 네트워크 구조 내에서의 물질의 운송을 어렵게 하고 세포에 기계적인 제한을 줄 수 있다. 그의 연구에서 또한 실크 피브로인의 농도 증가에 따른 구조체의 축소를 확인하였으며 실크 피브로인 농도가 높을수록 세포 배양 시 생존율이 낮아지는 결과를 보고하였다. 본 연구에서 또한, 실크 피브로인만을 사용하였을 때 같은 이유로 세포 생존율이 급격히 감소하였을 것이다. 반면, 젤라틴을 첨가하여 주었을 때, 베타-시트 형성 및 그들 사이의 상호작용에 의한 경직화가 덜 일어나게 되면서 세포에 가해지는 제한 또한 크게 줄었을 것이다. 젤라틴이 첨가된 하이드로젤은 S2G1을 제외하고 생존율이 유지되거나 증가하여 80%까지의 생존율을 보였다. 젤라틴이 높은 세포 적합성을 가져 초기 세포 생존을 도왔고, 결정화된 실크 피브로인에 비해 친수성 성질을 띠며 영양물질의 출입이 자유로워 스캐폴드에 효과적으로 부착된 세포가 활성을 유지하도록 도왔을 것이다. 특히 젤라틴의 아미노산 서열 중 RGD와 같은 세포 부착서열이 세포의 초기 부착 및 생존에 중요한 역할을 하며 세포의

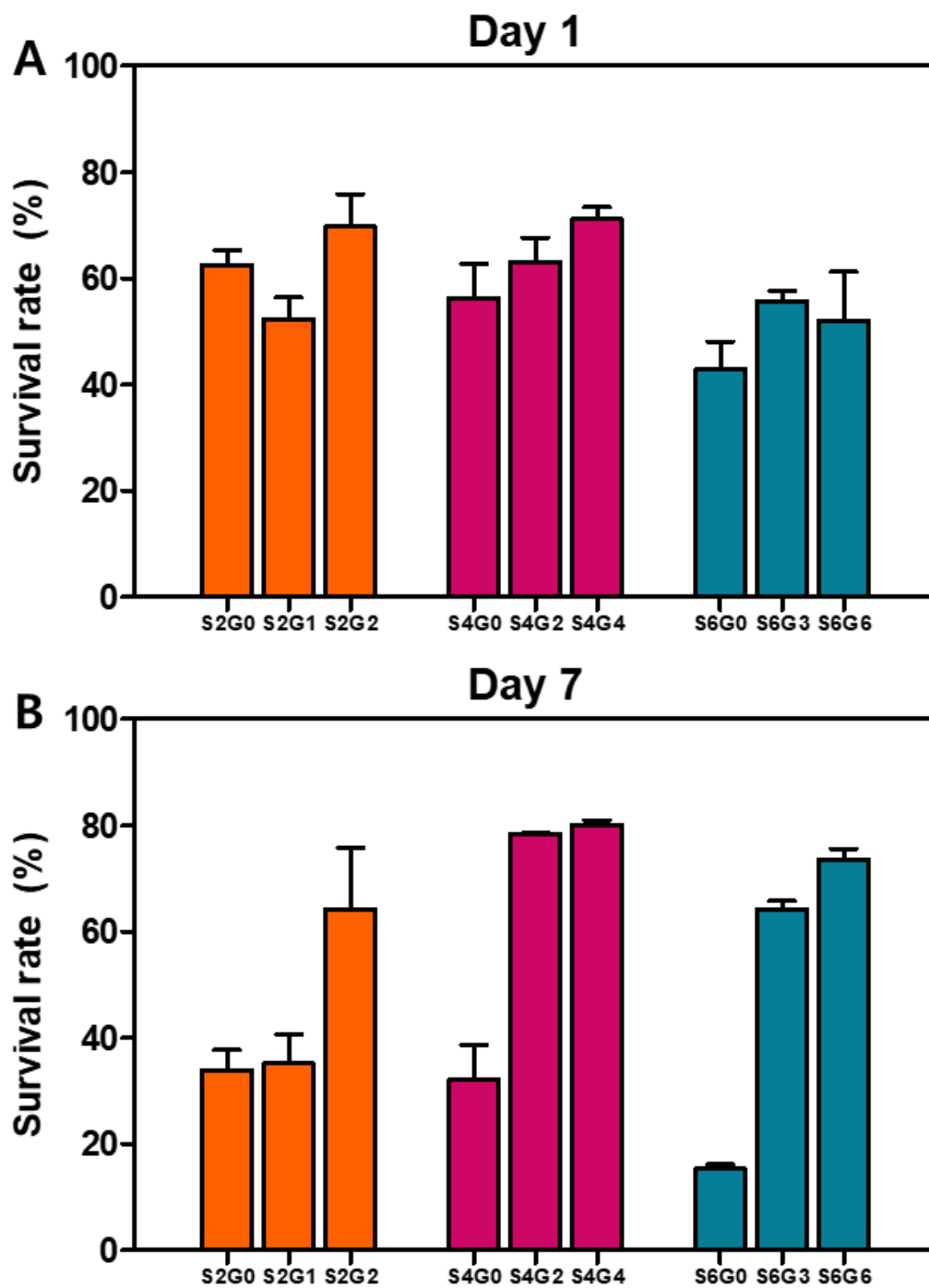


Figure 20. The survival rate of (A) Day 1, (B) Day 7 of each composition of hydrogel. (n = 3)

생존율이 실크 피브로인만을 사용한 경우에 비해 증가하였을 것이다. 7일 배양하였을 때에 젤라틴 존재 하에서 실크 피브로인 농도에 따른 세포 활성의 경향은 뚜렷하지 않았으나 S4에서 젤라틴을 첨가하였을 경우 다른 모든 조성보다 세포의 생존율이 높은 것으로 확인되었다. 세포 생존력의 일반적인 손실은 캡슐화 스트레스, 영양소 제한, 가공 중 건조 또는 매체에 넣은 후 일시적 팽창으로 인한 스트레스로 인해 발생할 수 있다. 광개시제 농도와 가시광선 노출 기간을 더 최적화하면 더 높은 초기 생존력이 생성될 것이다.

4.4. 바이오-잉크 최적 조건 고찰

앞서 얻어 낸 결합 특성, 변형, 프린팅 정확도, 물성 및 세포 활성을 모두 고려하여 최적 조건을 설정하였다. 본 연구에서는 37°C PBS에서 72 시간 보관하였을 때 처음 프린팅된 3차원 구조에서 가장 적은 구조 변화를 보이며, 한 층을 제작할 때 짚어준 영역 주변부에서 추가적인 가교가 적게 일어나며, 세포의 생존율 또한 높게 유지하는 조성을 최적 조건으로 판단하였다. 먼저 부피 및 질량 변화 결과에서는 72 시간 후의 상태가 초기 상태 대비 변화율이 0%여야 가장 이상적이다. S2G2, S4G2, S6G3이 각각 약 -15, -7, +20%의 부피 변화율 및 -4, -8, +9%의 질량 변화율을 보이며 이상적인 변형율(0%)과 가장 가까웠다. 그러나 2차원 상의 프린팅 정확도 측면에서 S2G2, S6G3은 300 ~ 400 μm 의 차이를 보임으로써 약 250 μm 의 차이를 보인 S4G2에 비해 프린팅 정확도가 떨어지는 것을 확인하였다. 세포 생존율 측면에서 S4G2는 S4G4를 제외하면 가장 높은 생존율을 보였다. 이에 따라 본 연구에서는 S4G2 잉크를 3차원 구조의 변형을 최소로 하며 적당한 프린팅 정확도를 가지고, 높은 세포 생존율을 가지는 하이드로젤 구조체를 제작할 수 있는 최적의 잉크 조건으로 설정하였다.

제 5 장 결 론

리보플라빈을 개시제로 사용하여 실크 피브로인 기반의 잉크를 가시광선을 이용해 프린팅할 수 있다는 것과 베타-시트의 형성으로 인해 3차원 구조의 축소가 일어나는 것을 확인하였다. 젤라틴을 실크 피브로인에 화학적으로 가교 시킴으로써 축소 현상을 방지할 수 있음을 확인하였다. 젤라틴을 복합화하지 않았을 때 실크 피브로인 하이드로젤에서 30 - 70%의 부피의 축소가 발생했다. 이를 방지하기 위한 스페이서로서 젤라틴을 도입하였고 이를 통해 3차원 구조의 변형을 효과적으로 방지할 수 있었다. 그러나 젤라틴 복합 시 잉크의 탁도가 높아짐에 따라 2차원 상의 프린팅 정확도는 감소하는 것을 확인하였다. 모든 S/G 조성에서 선형의 빛을 쬔어 젤화를 의도한 부위보다 실제 형성된 하이드로젤의 부위가 더 넓어지며 오차 발생하였다. 실크 피브로인만을 사용하였을 경우 100 μm , 젤라틴을 첨가하였을 경우 200-400 μm 의 오차가 생기며 첨가량에 따라 오차가 증가하는 것을 확인하였다. 젤라틴의 첨가에 따른 3차원 상에서의 정확도와 2차원 상에서의 정확도의 변화가 상반되는 결과를 보였다. 따라서 프린팅하는 구조의 전체 크기에 따라 허용되는 오차 범위를 고려하고, 부피의 축소를 방지할 수 있는 범위 내에서 젤라틴의 첨가량을 최소화하여 적절한 배합을 선택해야 할 것으로 보인다. 다양한 S/G 농도의 잉크에서 제작된 하이드로젤의 팽윤 특성, 젤 분율, 단면 구조, 압축 탄성률과 세포 활성을 관찰하였다. 실크 피브로인 잉크에 젤라틴을 첨가할수록 함수율 및 질량 팽창비가 증가하는 결과를 보였다. 젤 분율은 젤라틴 첨가에 따라 감소하였지만, 하이드로젤의 다이타이로신 결합의 형광 정도 및 건조 질량이 증가하는 것으로 보아 젤라틴이 화학적으로 복합화된 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 젤라틴을 넣지 않고 실크 피브로인만을 단독으로 프린팅할 경우 매우 강한 기계적

특성을 가졌으며 이는 실크 피브로인의 농도가 증가할수록 강화되고 세포에 물리적 제한을 주었다. 젤라틴을 넣음으로써 뛰어난 구조 안정성을 가진 하이드로젤을 얻을 수 있었다. 또한, 젤라틴을 첨가한 잉크를 바이오-프린팅하였을 때 제조된 하이드로젤이 세포를 담지하고 분화시키는 데에 적절한 기계적 물성을 지님으로써 실크 피브로인을 단독으로 프린팅하였을 때보다 높은 세포 활성을 보였다. 세포에 대한 활성은 개시제의 농도, 가시광선 노출 시간 등을 조절하여 더 개선할 수 있을 것으로 기대된다. 연구를 통해 실크 피브로인-젤라틴 복합 잉크의 3차원 프린팅 가능성 및 변형 거동과 물성, 형태를 확인하고 세포 담지 바이오-프린팅 잉크로서의 사용 가능성 또한 확인하였다. 또한, 새로운 3D 프린팅 잉크에 대한 프린팅 정확도의 평가 방식을 제안하였으며, 추후 실험에서도 참고할 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- [1] Chimene, David, et al. "Advanced bioinks for 3D printing: a materials science perspective." *Annals of biomedical engineering* 44.6 (2016): 2090-2102.
- [2] C. Mandrycky, et al. "3D bioprinting for engineering complex tissues." *Biotechnol. Adv.*, 34 (4) (2016), pp. 422-434
- [3] I.T. Ozbolat, Y. Yu, "Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends." *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 60 (3) (2013), pp. 691-699
- [4] Holzl, et al. "Bioink properties before, during and after 3D bioprinting." *Biofabrication*, 8 (3) (2016)
- [5] Xu, et al. "Fabrication and characterization of bio-engineered cardiac pseudo tissues." *Biofabrication*, 1 (3) (2009)
- [6] W. Zongjie, et al. "A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks." *Biofabrication*, 7 (4) (2015), p. 045009
- [7] Lin, Hang, et al. "Application of visible light-based projection stereolithography for live cell-scaffold fabrication with designed architecture." *Biomaterials* 34.2 (2013): 331-339.
- [8] F.R. de Gruijl, H.J. van Kranen, L.H.F. Mullenders. "UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer" *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 63 (1 - 3) (2001), pp. 19-27
- [9] Y. He, et al. "Research on the Printability of Hydrogels in 3D Bioprinting", vol. 6 (2016), p. 29977
- [10] Tao, Hu, et al. "Inkjet printing of regenerated silk fibroin: From printable forms to printable functions." *Advanced materials* 27.29 (2015): 4273-4279.
- [11] Wang, Xiaohong, et al. "Generation of three-dimensional

hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system." *Tissue engineering* 12.1 (2006): 83–90.

[12] Billiet, Thomas, et al. "The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability." *Biomaterials* 35.1 (2014): 49–62.

[13] Khalil, Saif, and Wei Sun. "Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs." *Journal of biomechanical engineering* 131.11 (2009): 111002.

[14] Inzana, Jason A., et al. "3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration." *Biomaterials* 35.13 (2014): 4026–4034.

[15] Ouyang, Liliang, et al. "3D printing of shear-thinning hyaluronic acid hydrogels with secondary cross-linking." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2.10 (2016): 1743–1751.

[16] Wang, Qiusheng, et al. "3D printing of silk fibroin for biomedical applications." *Materials* 12.3 (2019): 504.

[17] Kim, Chang Sup, et al. "A bioinspired dual-crosslinked tough silk protein hydrogel as a protective biocatalytic matrix for carbon sequestration." *NPG Asia Materials* 9.6 (2017): e391.

[18] Kim, Soon Hee, et al. "Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing." *Nature communications* 9.1 (2018): 1620.

[19] Applegate, Matthew B., et al. "Photocrosslinking of silk fibroin using riboflavin for ocular prostheses." *Advanced Materials* 28.12 (2016): 2417–2420.

[20] Kapoor, Sonia, and Subhas C. Kundu. "Silk protein-based hydrogels: promising advanced materials for biomedical applications." *Acta biomaterialia* 31 (2016): 17–32.

[21] Raia, Nicole R., et al. "Enzymatically crosslinked silk–hyaluronic

- acid hydrogels." *Biomaterials* 131 (2017): 58–67.
- [22] Kellie, John Fielding. *Development and Application of Technology for Streamlining Top-Down Proteomics*. Diss. Northwestern University, 2012.
- [23] Na, Kyunga, et al. "Effect of solution viscosity on retardation of cell sedimentation in DLP 3D printing of gelatin methacrylate/silk fibroin bioink." *Journal of industrial and engineering chemistry* 61 (2018): 340–347.
- [24] Eastoe, J. E. "The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin." *Biochemical Journal* 61.4 (1955): 589.
- [25] Ghezzi, Chiara E., et al. "3D functional corneal stromal tissue equivalent based on corneal stromal stem cells and multi-layered silk film architecture." *PloS one* 12.1 (2017): e0169504.
- [26] Truby, Ryan L., and Jennifer A. Lewis. "Printing soft matter in three dimensions." *Nature* 540.7633 (2016): 371.
- [27] Murphy, Sean V., and Anthony Atala. "3D bioprinting of tissues and organs." *Nature biotechnology* 32.8 (2014): 773.
- [28] Morrison, Robert J., et al. "Mitigation of tracheobronchomalacia with 3D-printed personalized medical devices in pediatric patients." *Science translational medicine* 7.285 (2015): 285ra64–285ra64.
- [29] Gupta, Maneesh K., et al. "3D printed programmable release capsules." *Nano letters* 15.8 (2015): 5321–5329.
- [30] Derby, Brian. "Printing and prototyping of tissues and scaffolds." *Science* 338.6109 (2012): 921–926.
- [31] Bandyopadhyay, Amit, Susmita Bose, and Suman Das. "3D printing of biomaterials." *MRS bulletin* 40.2 (2015): 108–115.
- [32] Zorlutuna, Pinar, Nihal Engin Vrana, and Ali Khademhosseini. "The expanding world of tissue engineering: the building blocks and new applications of tissue engineered constructs." *IEEE reviews in*

biomedical engineering 6 (2012): 47-62.

[33] Singh, Madhusudan, et al. "Inkjet printing—process and its applications." *Advanced materials* 22.6 (2010): 673-685.

[34] Ozbolat, Ibrahim T., and Yin Yu. "Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends." *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 60.3 (2013): 691-699.

[35] Guillotin, Bertrand, et al. "Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization." *Biomaterials* 31.28 (2010): 7250-7256.

[36] Grogan, Shawn P., et al. "Digital micromirror device projection printing system for meniscus tissue engineering." *Acta biomaterialia* 9.7 (2013): 7218-7226.

[37] Lin, Hang, et al. "Application of visible light-based projection stereolithography for live cell-scaffold fabrication with designed architecture." *Biomaterials* 34.2 (2013): 331-339.

[38] de Gruijl, Frank R., Henk J. van Kranen, and Leon HF Mullenders. "UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63.1-3 (2001): 19-27.

[39] Wang, Zongjie, et al. "Visible light photoinitiation of cell-adhesive gelatin methacryloyl hydrogels for stereolithography 3D bioprinting." *ACS applied materials & interfaces* 10.32 (2018): 26859-26869.

[40] Rutz, Alexandra L., et al. "A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell compatible hydrogels." *Advanced Materials* 27.9 (2015): 1607-1614.

[41] Mondal, M. "The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn.,—a review." *Caspian Journal of Environmental Sciences* 5.2 (2007): 63-76.

- [42] Zhou, Cong-Zhao, et al. "Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene." *Nucleic acids research* 28.12 (2000): 2413-2419.
- [43] Sundar, Sushmitha, Joydip Kundu, and Subhas C. Kundu. "Biopolymeric nanoparticles." *Science and Technology of Advanced Materials* 11.1 (2010): 014104.
- [44] Koh, Leng-Duei, et al. "Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials." *Progress in Polymer Science* 46 (2015): 86-110.
- [51-45] Vepari, Charu, and David L. Kaplan. "Silk as a biomaterial." *Progress in polymer science* 32.8-9 (2007): 991-1007.
- [46] Tansil, Natalia C., et al. "The use of molecular fluorescent markers to monitor absorption and distribution of xenobiotics in a silkworm model." *Biomaterials* 32.36 (2011): 9576-9583.
- [47] Rockwood, Danielle N., et al. "Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin." *Nature protocols* 6.10 (2011): 1612.
- [48] Altman, Gregory H., et al. "Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments." *Biomaterials* 23.20 (2002): 4131-4141.
- [49] Liu, Haifeng, et al. "The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering." *Biomaterials* 29.6 (2008): 662-674.
- [50] Tsioris, Konstantinos, et al. "Fabrication of silk microneedles for controlled release drug delivery." *Advanced Functional Materials* 22.2 (2012): 330-335.
- [51] Choudhury, Arup Jyoti, et al. "Controlled antibiotic-releasing *Antheraea assama* silk fibroin suture for infection prevention and fast wound healing." *Surgery* 159.2 (2016): 539-547.
- [52] Hofmann, S., et al. "Silk fibroin as an organic polymer for

controlled drug delivery." *Journal of Controlled Release* 111.1-2 (2006): 219-227.

[53] Yang, Yumin, et al. "Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration." *Biomaterials* 28.36 (2007): 5526-5535.

[54] Melke, Johanna, et al. "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering." *Acta biomaterialia* 31 (2016): 1-16.

[55] Sheikh, Faheem A., et al. "3D electrospun silk fibroin nanofibers for fabrication of artificial skin." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11.3 (2015): 681-691.

[56] Gil, Eun Seok, et al. "Functionalized silk biomaterials for wound healing." *Advanced healthcare materials* 2.1 (2013): 206-217.

[57] Patil, Sharvil, Tom George, and Kakasaheb Mahadik. "Green synthesized nanosilver loaded silk fibroin gel for enhanced wound healing." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 30 (2015): 30-36.

[58] Buitrago, Jennifer O., et al. "Silk fibroin/collagen protein hybrid cell-encapsulating hydrogels with tunable gelation and improved physical and biological properties." *Acta biomaterialia* 69 (2018): 218-233.

[59] Arai, Takayuki, et al. "Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films." *Journal of Applied Polymer Science* 91.4 (2004): 2383-2390.

[60] Valluzzi, Regina, et al. "Orientation of silk III at the air-water interface." *International Journal of Biological Macromolecules* 24.2-3 (1999): 237-242.

[61] Luo, Kunyuan, Yuhong Yang, and Zhengzhong Shao. "Physically Crosslinked Biocompatible Silk Fibroin Based Hydrogels with High Mechanical Performance." *Advanced Functional Materials* 26.6 (2016):

872-880.

[62] Min, Byung-Moo, et al. "Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro." *Biomaterials* 25.7-8 (2004): 1289-1297.

[63] Wang, Xiaoqin, et al. "Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation." *Biomaterials* 29.8 (2008): 1054-1064.

[64] Li, Mingzhong, et al. "Controlling molecular conformation of regenerated wild silk fibroin by aqueous ethanol treatment." *Polymers for Advanced Technologies* 14.10 (2003): 694-698.

[65] Partlow, Benjamin P., et al. "Highly tunable elastomeric silk biomaterials." *Advanced functional materials* 24.29 (2014): 4615-4624.

[66] Haraguchi, Kazutoshi, and Toru Takehisa. "Nanocomposite hydrogels: a unique organic - inorganic network structure with extraordinary mechanical, optical, and swelling/de swelling properties." *Advanced materials* 14.16 (2002): 1120-1124.

[67] Partlow, Benjamin P., et al. "Tyrosine templating in the self-assembly and crystallization of silk fibroin." *Biomacromolecules* 17.11 (2016): 3570-3579.

[68] Stoppel, Whitney L., et al. "Elastic, silk cardiac extracellular matrix hydrogels exhibit time dependent stiffening that modulates cardiac fibroblast response." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 104.12 (2016): 3058-3072.

[69] Kasoju, Naresh, et al. "Silk fibroin gelation via non-solvent induced phase separation." *Biomaterials science* 4.3 (2016): 460-473.

[70] Li, Mingzhong, et al. "Compliant film of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin by chemical crosslinking." *International Journal of Biological Macromolecules* 32.3-5 (2003): 159-163.

[71] Mandal, Biman B., Sonia Kapoor, and Subhas C. Kundu. "Silk

fibroin/polyacrylamide semi-interpenetrating network hydrogels for controlled drug release." *Biomaterials* 30.14 (2009): 2826–2836.

[72] Rattanamanee, Atcharaporn, et al. "Effect of Gelatin on Secondary Structure, Crystallinity and Swelling Behavior of Silk Fibroin-Gelatin Hydrogels and its Application in Controlled Release of Nitrogen." *Advanced Materials Research*. Vol. 750. Trans Tech Publications, 2013.

[73] Joly-Duhamel, Christine, Dominique Hellio, and Madeleine Djabourov. "All gelatin networks: 1. Biodiversity and physical chemistry." *Langmuir* 18.19 (2002): 7208–7217.

[74] Van Vlierberghe, Sandra, Peter Dubrue, and Etienne Schacht. "Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review." *Biomacromolecules* 12.5 (2011): 1387–1408.

[75] Kuijpers, Alma J., et al. "Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 11.3 (2000): 225–243.

[76] Das, Sanskrita, et al. "Bioprintable, cell-laden silk fibroin - gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs." *Acta biomaterialia* 11 (2015): 233–246.

[77] Peng, Zhiyuan, Zhiping Peng, and Yongqiang Shen. "Fabrication and properties of gelatin/chitosan composite hydrogel." *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 50.11 (2011): 1160–1164.

[78] Hutson, Che B., et al. "Synthesis and characterization of tunable poly (ethylene glycol): gelatin methacrylate composite hydrogels." *Tissue Engineering Part A* 17.13–14 (2011): 1713–1723.

[79] Xiao, Wenqian, et al. "Ultrasonication and genipin cross-linking to prepare novel silk fibroin - gelatin composite hydrogel." *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 27.4 (2012): 327–341.

- [80] Nichol, Jason W., et al. "Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels." *Biomaterials* 31.21 (2010): 5536–5544.
- [81] Dixon, James M., Masahiko Taniguchi, and Jonathan S. Lindsey. "PhotochemCAD 2: A Refined Program with Accompanying Spectral Databases for Photochemical Calculations." *Photochemistry and photobiology* 81.1 (2005): 212–213.
- [82] Wollensak, Gregor, Eberhard Spoerl, and Theo Seiler. "Riboflavin/ultraviolet-A - induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus." *American journal of ophthalmology* 135.5 (2003): 620–627.
- [83] Park, Hyejin, et al. "Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering." *Acta biomaterialia* 9.1 (2013): 4779–4786.
- [84] Batchelor, R. R., et al. "(–)-Riboflavin (vitamin B2) and flavin mononucleotide as visible light photo initiators in the thiol - ene polymerisation of PEG-based hydrogels." *Polymer Chemistry* 8.6 (2017): 980–984.
- [85] Ibusuki, Shinichi, et al. "Photochemically cross-linked collagen gels as three-dimensional scaffolds for tissue engineering." *Tissue engineering* 13.8 (2007): 1995–2001.
- [86] Kato, Yoji, Koji Uchida, and Shunro Kawakishi. "Aggregation of collagen exposed to UVA in the presence of riboflavin: a plausible role of tyrosine modification." *Photochemistry and photobiology* 59.3 (1994): 343–349.
- [87] Partlow, Benjamin P., et al. "Dityrosine cross-linking in designing biomaterials." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2.12 (2016): 2108–2121.
- [88] Um, In Chul, et al. "Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid." *International*

journal of biological macromolecules 29.2 (2001): 91–97.

[89] Kwak, Hyo Won, et al. "Sericin promotes fibroin silk i stabilization across a phase-separation." *Biomacromolecules* 18.8 (2017): 2343–2349.

[90] Lammel, Andreas S., et al. "Controlling silk fibroin particle features for drug delivery." *Biomaterials* 31.16 (2010): 4583–4591.

[91] Liebmann, Burghard, et al. "Formulation of poorly water-soluble substances using self-assembling spider silk protein." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 331.1–2 (2008): 126–132.

[92] Terry, Ann E., et al. "pH Induced Changes in the Rheology of Silk Fibroin Solution from the Middle Division of *Bombyx mori* Silkworm." *Biomacromolecules* 5.3 (2004): 768–772.

[93] Cheng, Yuan, et al. "On the strength of β -sheet crystallites of *Bombyx mori* silk fibroin." *Journal of The Royal Society Interface* 11.96 (2014): 20140305.

Abstract

Silk fibroin/gelatin composite ink for 3D printing in visible light and its printability

Hyunji Lee

Biomaterials Engineering

The Graduate School

Seoul National University

It describes a silk based ink material for digital light processing (DLP) 3D printing. Silk fibroin (SF) and gelatin were chosen due to their biocompatibility to cell viability. Riboflavin, a natural enzyme, initiated the crosslinking of SF molecules in the irradiation of visible range of light and formed an SF hydrogel through dityrosine bonding. However, the SF hydrogels were shrunk in phosphate buffered saline solution at 37°C due to the rapid formation of β -sheet structure. Effectively, the shrinkage of the SF hydrogel was prevented by the addition of gelatin to SF ink. As the ratio of gelatin in the composite ink increased, the density of β -sheet structures was reduced and the structural deformation of the 3D SF-gelatin hydrogel was decreased. However, the addition of gelatin increased the turbidity of the SF-gelatin composite ink and reduced the printing accuracy due to the development of light scattering in the DLP printing. The physical

properties of the printed hydrogels and the detailed printing process were discussed.

keywords : 3D DLP printing, silk fibroin, gelatin, riboflavin,
hydrogel, dimensional stability, printing accuracy

Student Number : 2017-29451